



Uniwersytet Rolniczy
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa

mgr Małgorzata Hałat-Łaś

**Bioremediacja zanieczyszczeń w eutrofizowanych
cieczach pofermentacyjnych z wykorzystaniem
mikroorganizmów oraz ich konsorcjów**

*Rozprawa doktorska wykonana
w Katedrze Biologii Roślin i Biotechnologii
pod kierunkiem dr hab. Pawła Kaszyckiego, prof. URK*

Kraków, 2023

*Pragnę serdecznie podziękować wszystkim, którzy przyczynili się
do powstania niniejszej pracy,
szczególnie promotorowi, **dr hab. Pawłowi Kaszyckiemu, prof. URK***

*za umożliwienie mi podjęcia i wykonania badań związanych
z tematem prezentowanej rozprawy doktorskiej,
za poświęcony czas, a także za wszystkie cenne sugestie
i krytyczne uwagi do rozprawy oraz
za cierpliwość i wyrozumiałość*

Rodzicom,

za to, że zawsze mogłam liczyć na Waszą pomoc i wsparcie.

Mojemu mężowi Mirosławowi i synkowi Kubusiowi,

*za to, że jesteście!
za wiarę w moje możliwości, ogromne wsparcie,
cierpliwość i wyrozumiałość*

Chciałam również gorąco podziękować

Panu dr hab. inż. Sebastianowi Borowskiemu, prof. PŁ

*za poświęcony czas i liczne dyskusje w sprawie koncepcji związanych
z biotechnologią produkcji biowodoru i biogazu
oraz za przygotowanie i przekazanie materiałów do mojej pracy
w postaci odcieków pochodzących z modelowych instalacji*

***Panu dr hab. Przemysławowi Malcowi, prof. UJ
i Panu dr Pawłowi Jedynakowi***

*za konsultacje i dyskusje przy problematyce
związanej z oczyszczaniem cieczy pofermentacyjnych
oraz za owocną współpracę*

moim Kolegą i Współpracownikom z Zakładu Biochemii

*dr Annie Kosteckiej-Gugale,
dr inż. Iwonie Ledwożyw-Smoleń,
dr inż. Paulinie Supel,
dr inż. Przemysławowi Petryszakowi,
mgr inż. Michałowi Kruczkowi,
mgr inż. Katarzynie Starzec,
mgr Marcie Śliwie-Cebuli,
mgr inż. Kindze Regdos,
oraz mgr inż. Magdalenie Nuckowskiej
za życzliwość, nieocenioną pomoc i
liczne inspirujące dyskusje*

Współpracownikom z firmy ORGANIKA-AGRARIUS sp. z o. o.

*Prezesowi Zenonowi Borys
Prokurentowi Andrzejowi Lenczyk
oraz dr inż. Annie Ambroszczyk
za wsparcie i wyrozumiałość*

Spis treści

1. Wstęp.....	18
2. Przegląd literatury	20
2.1 Bioremediacja. Mikrobiologiczne unieszkodliwianie zanieczyszczeń	20
2.1.1 Bioremediacja jako korzystna alternatywa dla innych metod oczyszczania.....	21
2.1.2 Czynniki warunkujące skuteczność procesu bioremediacji	22
2.1.3 Bioremediacja w praktyce środowiskowej – rodzaje stosowanych technologii	24
2.2 Zanieczyszczenia wód, eutrofizacja i czynniki zagrożeń w kontekście działalności przemysłowej.....	25
2.3 Odnawialne źródła energii: perspektywy, regulacje prawne i problemy środowiskowe	29
2.4 Biogaz i jego wartość energetyczna.....	31
2.4.1 Fermentacja metanowa i produkcja biogazu.....	31
2.4.2 Substraty do produkcji biogazu	31
2.4.3 Masa pofermentacyjna, metody jej zagospodarowania i potrzeba oczyszczania odcieków	33
2.5 Biowodór.....	36
2.5.1 Fermentacja ciemna i i produkcja biowodoru.....	36
2.5.2 Substraty do produkcji wodoru metodą ciemnej fermentacji	39
2.5.3 Masa pofermentacyjna – waloryzacja i jej dalsze wykorzystanie	40
2.5.4 Odciek po fermentacji wodorowej – charakterystyka i potrzeba oczyszczania.....	43
3. Badania własne	45
3.1 Hipotezy i cele badawcze	45
3.2 Materiały i metody	47
3.2.1 Materiał badawczy: ciecze pofermentacyjne	47
3.2.2 Materiał mikrobiologiczny – bakterie środowiskowe, konsorcja drobnoustrojów i osad czynny .	49
3.2.3 Podłoża mikrobiologiczne i odczynniki chemiczne	53
3.2.4 Metody badawcze i analityczne.....	58

4.	<i>Wyniki badań</i>	68
4.1	Badania odcieków powstałych w wyniku fermentacji metanowej w laboratoryjnej instalacji modelowej	68
4.1.1	Analiza fizykochemiczna i mikrobiologiczna odcieków	68
4.1.2	Określenie potencjału mikrobioty autochtonicznej w usuwaniu zanieczyszczeń	71
4.1.3	Testy toksyczności cieczy pofermentacyjnych i analizy oczyszczania z użyciem biopreparatu ZB-01	72
4.1.4	Badanie toksyczności odcieków względem drożdży i określenie potencjału wybranych szczepów w usuwaniu zanieczyszczeń.....	74
4.2	Badania cieczy pofermentacyjnej pozyskanej z biogazowni rolniczej – instalacji biometanizacji gnojowicy świńskiej	85
4.3	Badania odcieków powstających podczas fermentacji metanowej osadów ściekowych miejskich oczyszczalni ścieków	87
4.3.1	Ciecze pofermentacyjne po biometanizacji osadów ściekowych w Bielsku-Białej.....	87
4.3.2	Ciecze pofermentacyjne po biometanizacji osadów ściekowych w Krzeszowicach	103
4.4	Badania cieczy pofermentacyjnych powstałych podczas fermentacji ciemniej w modelowej instalacji wytwarzania biowodoru	116
4.4.1	Analiza fizykochemiczna i mikrobiologiczna odcieków	116
4.4.2	Badania toksyczności odcieków względem bakterii allochtonicznych.....	117
4.4.3	Określenie toksyczności względem drożdży	119
4.4.4	Biologiczne oczyszczanie cieczy pofermentacyjnych z produkcji biowodoru. Wykorzystanie drożdży <i>Yarrowia lipolytica</i> do bioremediacji toksycznego odcieku MP+	122
4.4.5	Biologiczne oczyszczanie cieczy pofermentacyjnych z produkcji biowodoru. Opracowanie konsorcjum zdolnego do oczyszczania cieczy pofermentacyjnych w oparciu o drobnoustroje autochtoniczne	123
5.	<i>Dyskusja</i>	135
6.	<i>Wnioski – weryfikacja postawionych hipotez</i>	147
7.	<i>Streszczenie w języku polskim</i>	148
8.	<i>Streszczenie w języku angielskim</i>	150
9.	<i>Bibliografia</i>	152

Spis skrótów

- OZE – odnawialne źródła energii
- OD – gęstość optyczna (ang. *Optical density*)
- ChZT – chemiczne zapotrzebowanie tlenu
- OWO – ogólny węgiel organiczny
- jtk – jednostki tworzące kolonie
- P_{og.} – fosfor ogólny
- N_{og.} – azot ogólny
- NH₄⁺ – N – zapis zawartości azotu występującego w formie amonowej
- NO₃⁻/NO₂⁻ – N – zapis zawartości azotu występującego w formie azotanowej i azotynowej
- PO₄³⁻ – P – zapis zawartości fosforu występującego w formie fosforanowej
- *Chlorella sorokiniana* – *Chlorella sorokiniana* szczep SAG 211-8k
- Konsorcjum ZTT-3 – mieszane konsorcjum bakteryjno-glonowe z przewagą *Chlorophyta*
- Konsorcjum SB – konsorcjum bakterii glebowych, składające się ze szczepów: *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* i *Rhizobium radiobacter*
- Konsorcjum ZB-01 – tlenowa, bioróżnorodna i biologicznie zrównoważona społeczność bakterii, składająca się z wielu naturalnie występujących szczepów środowiskowych, zdolnych do biodegradacji różnych trudno rozkładalnych związków, wytworzona w Zakładzie Biochemii KBRiB UR
- Konsorcjum BLL – bioróżnorodna wspólnota autochtonicznych drobnoustrojów amoniofilnych, wyodrębnionych przez grupę kierowaną przez prof. Przemysława Malca z Wydziału BBiB UJ
- Konsorcjum DFMC – wytworzone na bazie mikroorganizmów autochtonicznych wyizolowanych z cieczy po fermentacji wodorowej (ang. *Dark Fermentation Microbial Consortium*)
- Biogaz – mieszanina gazów powstająca w procesie beztlenowej fermentacji metanowej, składająca się głównie z metanu i dwutlenku węgla. Może również zawierać nieznaczne ilości siarkowodoru, wodoru, wody, tlenku węgla oraz siloksanów
- VFAs – lotne (krótkołańcuchowe) kwasy organiczne – (ang. *Volatile fatty acids*)
- MGE – ruchome elementy genetyczne (ang. *Mobile genetic elements*)
- HGT – horyzontalny transfer genów (ang. *Horizontal gene transfer*)
- Stosunek C:N – stosunek zawartości węgla do azotu w ściekach
- Staunek C:N:P – stosunek zawartości węgla do azotu do fosforu w ściekach
- WWA – wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne
- Fd – ferredoksyna

- PGPB – bakterie sprzyjające wzrostowi roślin (ang. *Plant Growth-Promoting Bacteria*)
- MFC – mikrobiologiczne ogniwa paliwowe (ang. *Microbial fuel cell*)
- MEC – bioelektroliza (ang. *Microbial electrolysis cell*)
- SVI – indeks osadowy Mohlmana
- MALDI – TOF MS – technika diagnostyczna, pozwalającym na jednoznaczną identyfikację drobnoustrojów dzięki analizie metodą spektrometrii masowej z wykorzystaniem desorpcji/jonizacji laserowej
- TVFA – ogólna zawartość kwasów organicznych (ang. *Total volatile fatty acids*)

Spis Rycin

Ryc. 1. Czynniki wpływające na proces bioremediacji [opracowanie własne].....	22
Ryc. 2. Przykłady zbiorników wód stojących z widocznym skutkiem eutrofizacji.....	28
Ryc. 3. Podział substratów wykorzystywanych do produkcji biogazu [opracowanie własne]	33
Ryc. 4. Metody oczyszczania frakcji ciekłej masy pofermentacyjnej [opracowanie własne]	34
Ryc. 5. Reakcja biofotolizy wody	37
Ryc. 6. Reakcja fotofermentacji charakterystyczna dla bakterii rodzaju <i>Rhodobacter</i>	37
Ryc. 7. Reakcje wytwarzania biowodoru w procesie tzw. fermentacji ciemnej	38
Ryc. 8. Substraty do produkcji biowodoru (odpady komunalne i przemysłowe zawierające skrobię) [Das i Basak 2021]	39
Ryc. 9. Schemat przedstawiający sposoby waloryzacji masy powstałej po fermentacji ciemnej [Sivagurunathan i in. 2017]	42
Ryc. 10. Przykład badanych odcieków – kolba z cieczą powstałą w wyniku fermentacji pomiotu kurzego (odciek E)	47
Ryc. 11. Obrazy mikroskopowe konsorcjum ZTT-3 (po lewej) oraz szczepu <i>Chlorella sorokiniana</i> SAG 211-8k [Fot. własna].....	50
Ryc. 12. Bioreaktory z hodowlą biopreparatu ZB-01, Zespół Biochemii, KBRiB, UR	51
Ryc. 13. Osad czynny bezpośrednio po pobraniu z komory napowietrzania oczyszczalni ścieków [Fot. własna].....	53
Ryc. 14. Lej Imhoffa z osadem czynnym w trakcie analiz zdolności sedymentacyjnych	61
Ryc. 15. Szalka przedstawiająca kolonie drożdży <i>Yarrowia lipolytica</i> zastosowanych do bioremediacji odcieku MP+	64
Ryc. 16. Obrazy mikroskopowe odcieków poddanych barwieniu Grama, pow. 1000x	70
Ryc. 17. Dynamika populacji bakterii autochtonicznych podczas inkubacji odcieków A, B, C+D i E w warunkach napowietrzania przez okres 7 dni	71
Ryc. 18. Wyniki analiz toksyczności odcieków pofermentacyjnych względem drobnoustrojów biopreparatu ZB-01. Kontrola – biopreparat ZB-01 inkubowany w płynnym	

podłożu minimalnym (słupki niebieskie – kontrola, pozostałe słupki – poszczególne odcieki + biopreparat)	73
Ryc. 19. Zdjęcia mikroskopowe hodowli badanych drożdży, pow. 1000x.....	74
Ryc. 20. Dynamika populacji drożdży <i>Candida</i> sp. D11 (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek A + drożdże)	75
Ryc. 21. Dynamika populacji drożdży <i>Hansenula polymorpha</i> (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek A + drożdże)	75
Ryc. 22. Dynamika populacji drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek A + drożdże).....	76
Ryc. 23. Dynamika populacji drożdży <i>Trichosporon</i> sp. (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek A + drożdże)	76
Ryc. 24. Dynamika populacji drożdży <i>Candida</i> sp. D11 (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek B + drożdże)	77
Ryc. 25. Dynamika populacji drożdży <i>Hansenula polymorpha</i> (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek B + drożdże)	78
Ryc. 26. Dynamika populacji drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek B + drożdże)	78
Ryc. 27. Dynamika populacji drożdży <i>Trichosporon</i> sp. (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek B + drożdże)	79
Ryc. 28. Dynamika populacji drożdży <i>Candida</i> sp. D11 (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek C+D + drożdże)	80
Ryc. 29. Dynamika populacji drożdży <i>Hansenula polymorpha</i> (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek C+D + drożdże)	80
Ryc. 30. Dynamika populacji drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek C+D + drożdże).....	81
Ryc. 31. Dynamika populacji drożdży <i>Trichosporon</i> sp. (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek C+D + drożdże)	81
Ryc. 32. Dynamika populacji drożdży <i>Candida</i> sp. D11 (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek E + drożdże).....	82
Ryc. 33. Dynamika populacji drożdży <i>Hansenula polymorpha</i> (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek E + drożdże).....	83

Ryc. 34. Dynamika populacji drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek E + drożdże)	83
Ryc. 35. Dynamika populacji drożdży <i>Trichosporon</i> sp. (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek E + drożdże).....	84
Ryc. 36. Dynamika populacji bakterii autochtonicznych (słupki niebieskie) i sumy bakterii po bioaugmentacji odcieku BSZ konsorcjum BLL (słupki pomarańczowe) podczas testu biooczyszczania	86
Ryc. 37. Dynamika populacji bakterii autochtonicznych podczas inkubacji odcieku BB w warunkach napowietrzania	88
Ryc. 38. Dynamika populacji bakterii podczas inkubacji odcieku BB z bakteriami <i>Pseudomonas</i> sp. 18 (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek + bakterie)	90
Ryc. 39. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieku BB z drożdżami <i>Candida</i> sp. D11 (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek + drożdże).....	90
Ryc. 40. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieku BB z drożdżami <i>Hansenula polymorpha</i> (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + drożdże).....	91
Ryc. 41. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieku BB z drożdżami <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + drożdże).....	91
Ryc. 42. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieku BB z drożdżami <i>Trichosporon</i> sp. (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + drożdże).....	92
Ryc. 43. Dynamika populacji bakterii podczas inkubacji odcieku BB z konsorcjum SB: <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Rhizobium radiobacter</i> (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + konsorcjum).....	92
Ryc. 44. Dynamika populacji bakterii podczas inkubacji odcieku BB z biopreparatem ZB-01 (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek + konsorcjum)	93
Ryc. 45. Dynamika populacji bakterii podczas inkubacji odcieku BB z bakteriami <i>Zoogloea ramigera</i> DSMZ (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek + bakterie)	93
Ryc. 46. Dynamika populacji bakterii osadu czynnego podczas inkubacji odcieku BB z osadem czynnym pochodzącym z oczyszczalni ścieków w Krzeszowicach (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek + osad czynny)	94
Ryc. 47. Dynamika populacji bakterii podczas inkubacji odcieku BB zaszczerpionego biocenozą ZB-01 (słupki pomarańczowe), biocenozą ZB-01 + <i>Candida</i> sp. D11 (słupki szare), oraz biocenozą ZB-01 + <i>Trichosporon</i> sp. (słupki żółte).....	96

Ryc. 48. Zmiany liczebności drożdży <i>Candida</i> sp. D11 (słupki szare) i <i>Trichosporon</i> sp. (słupki żółte) podczas inkubacji w odcieku BB zaszczerpionym biocenozą ZB-01	97
Ryc. 49. Dynamika populacji bakterii <i>Pseudomonas</i> sp. 18 podczas inkubacji w odcieku BB wstępnie oczyszczanym za pomocą konsorcjum mikroalg ZYT i szczepu <i>Chlorella sorokiniana</i> (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + bakterie)	99
Ryc. 50. Dynamika populacji bakterii konsorcjum SB (<i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Rhizobium radiobacter</i>) podczas inkubacji w odcieku BB wstępnie oczyszczanym za pomocą konsorcjum mikroalg ZYT i szczepu <i>Chlorella sorokiniana</i> (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + konsorcjum)	99
Ryc. 51. Dynamika populacji bakterii <i>Zoogloea ramigera</i> podczas inkubacji w odcieku BB wstępnie oczyszczanym za pomocą konsorcjum mikroalg ZYT i szczepu <i>Chlorella sorokiniana</i> (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + bakterie)	100
Ryc. 52. Dynamika populacji bakterii osadu czynnego podczas inkubacji w odcieku BB wstępnie oczyszczanym za pomocą konsorcjum mikroalg ZYT i szczepu <i>Chlorella sorokiniana</i> (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek + osad czynny)	100
Ryc. 53. Obraz mikroskopowy przedstawiający klaczki osadu czynnego po 7 dniach inkubacji kontrolnej w warunkach napowietrzania, pow. 400x	101
Ryc. 54. Obraz mikroskopowy przedstawiający klaczki osadu czynnego po 7 dniach inkubacji z odciekiem BB w warunkach napowietrzania, pow. 400x.....	101
Ryc. 55. Obraz mikroskopowy przedstawiający osad czynny po 7 dniach inkubacji z odciekiem BB wstępnie oczyszczanym za pomocą konsorcjum mikroalg ZYT i szczepu <i>Chlorella sorokiniana</i>) w warunkach napowietrzania, pow. 400x.....	102
Ryc. 56. Dynamika populacji bakterii autochtonicznych podczas inkubacji odcieku KK w warunkach napowietrzania	104
Ryc. 57. Dynamika populacji bakterii podczas inkubacji odcieku KK z bakteriami <i>Pseudomonas</i> sp. 18 (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + bakterie)	105
Ryc. 58. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieku KK z drożdżami <i>Candida</i> sp. D11 (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + drożdże).....	106
Ryc. 59. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieku KK z drożdżami <i>Hansenula polymorpha</i> (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + drożdże).....	106
Ryc. 60. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieku KK z z drożdżami <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + drożdże)	107

Ryc. 61. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieku KK z drożdżami <i>Trichosporon</i> sp. (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + drożdże)	107
Ryc. 62. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieku KK z drożdżami <i>Yarrowia lipolytica</i> (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + drożdże)	108
Ryc. 63. Dynamika populacji bakterii podczas inkubacji odcieku KK z konsorcjum SB (<i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Rhizobium radiobacter</i>) (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + konsorcjum)	108
Ryc. 64. Dynamika populacji bakterii podczas inkubacji odcieku KK z biocenozą ZB-01 (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + konsorcjum)	109
Ryc. 65. Dynamika populacji bakterii podczas inkubacji odcieku KK z bakteriami <i>Zoogloea ramigera</i> (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + bakterie)	109
Ryc. 66. Dynamika populacji bakterii wolnopływających podczas inkubacji odcieku KK z osadem czynnym (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + osad czynny) ...	110
Ryc. 67. Obraz mikroskopowy przedstawiający osad czynny po 7 dniach inkubacji w warunkach napowietrzania, 400x	110
Ryc. 68. Obraz mikroskopowy przedstawiający osad czynny po 7 dniach inkubacji w warunkach napowietrzania z odciekiem KK, 400x	110
Ryc. 69. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieku KK z drożdżami <i>Trichosporon</i> sp. (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + drożdże)	112
Ryc. 70. Dynamika populacji drożdży <i>Trichosporon</i> sp. podczas inkubacji odcieku KK suplementowanego różnymi źródłami węgla	114
Ryc. 71. Dynamika populacji bakterii podczas inkubacji odcieków po fermentacji wodorowej z bakteriami <i>Pseudomonas</i> sp. 18	117
Ryc. 72. Dynamika populacji bakterii podczas inkubacji odcieków po fermentacji wodorowej z bakteriami <i>Zoogloea ramigera</i>	118
Ryc. 73. Dynamika populacji bakterii podczas inkubacji odcieków po fermentacji wodorowej z konsorcjum SB	118
Ryc. 74. Dynamika populacji bakterii podczas inkubacji odcieków po fermentacji wodorowej z konsorcjum ZB-01	119
Ryc. 75. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieków po fermentacji wodorowej z drożdżami <i>Candida</i> sp. D11	120

Ryc. 76. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieków po fermentacji wodorowej z drożdżami <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	120
Ryc. 77. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieków po fermentacji wodorowej z drożdżami <i>Hansenula polymorpha</i>	121
Ryc. 78. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieków po fermentacji wodorowej z drożdżami <i>Trichosporon</i> sp.	121
Ryc. 79. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieków po fermentacji wodorowej z drożdżami <i>Yarrowia lipolytica</i>	122
Ryc. 80. Schemat przedstawiający izolaty bakteryjne pozyskane z poszczególnych odcieków (szare kwadraty) oraz wspólny wzrost kolonii bakterii na szalce po integracji hodowli w celu wytworzenia aktywnego konsorcjum (czarne koło). Strzałkami zaznaczono poszczególne izolaty wchodzące w skład konsorcjum [Fot. własne]	126
Ryc. 81. Zdjęcie przedstawiające kolonie drożdży wyizolowanych z odcieku TP+ [Fot. własna].....	126
Ryc. 82. Dynamika liczebności bakterii autochtonicznych występujących w badanych odciekach MP+, TP+, MP- i TP- podczas 7-dniowej inkubacji w warunkach napowietrzania	127
Ryc. 83. Dynamika populacji bakterii w konsorcjum DFMC podczas inkubacji z odciekami po fermentacji wodorowej (słupki niebieskie – kontrola, pozostałe słupki – odcieki)	128
Ryc. 84. Dynamika populacji drożdży w konsorcjum DFMC podczas inkubacji z odciekami po fermentacji wodorowej (słupki niebieskie – kontrola, pozostałe słupki – odcieki)	128
Ryc. 85. Diagram przedstawiający wyniki analiz wartości indeksu Mohlmana SVI dla osadu czynnego rozcieńczonego z wodą (osad czynny : woda, 1:4) oraz z odciekami pofermentacyjnymi w stosunku 1:4. Czerwoną linią zaznaczono krytyczną wartość progową 120 mL/g s.m. Wartości SVI powyżej 120 mL/ g s.m. wskazują na pęcznienie osadu i świadczą o jego złej kondycji.....	131
Ryc. 86. Analizy liczebności bakterii wolnopływających w próbkach odcieków pofermentacyjnych zmieszanych z osadem czynnym w stosunku 1:4. Wyższa liczebność bakterii wolnopływające w próbkach odcieków nietraktowanych wstępnie konsorcjum mikroorganizmów autochtonicznych DFMC świadczy o gorszej kondycji osadu czynnego (słabsza integracja bakterii z kłaczkami osadu czynnego)	132
Ryc. 87. Obraz mikroskopowy (pow. 400x) osadu czynnego w dniu pobrania z oczyszczalni ścieków	133
Ryc. 88. Obraz mikroskopowy (pow. 400x) osadu czynnego po 7 dniach w warunkach napowietrzania – doświadczenie kontrolne	133

Ryc. 89. A-D. Zdjęcia przedstawiające obrazy mikroskopowe (pow. 400x) osadu czynnego po 7 dniach inkubacji z odciekami surowymi (A – MP+; B – MP-; C - TP+; D – TP-).....	133
Ryc. 90. A-D. Zdjęcia przedstawiające obrazy mikroskopowe (pow. 100x) osadu czynnego po 7 dniach inkubacji z odciekami wstępnie oczyszczanymi za pomocą konsorcjum mikroorganizmów autochtonicznych DFMC (A – MP+; B – MP-; C - TP+; D – TP-).....	134
Ryc. 91. Schemat przedstawiający etapy zagospodarowania masy pofermentacyjnej [opracowanie własne].....	139

Spis Tabel

Tabela 1. Skład chemiczny biogazu [Kwaśny J. i in. 2012].....	32
Tabela 2. Skład płynnego podłoża wzrostowego SNB, optymalnego dla bakterii.....	54
Tabela 3. Skład podłoża minimalnego Bushnell-Haas (BH).....	54
Tabela 4. Skład podłoża agar wzbogacony (AW)	55
Tabela 5. Skład podłoża Agar Sabouraud z chloramfenikolem (SAB).....	56
Tabela 6. Skład podłoża YPD.....	56
Tabela 7. Skład podłoża płynnego YCU	57
Tabela 8. Skład podłoża płynnego do hodowli biopreparatu ZB-01	57
Tabela 9. Zestawienie testów LCK z podaniem zakresów oznaczalności analitów.....	67
Tabela 10. Wstępna charakterystyka surowych cieczy pofermentacyjnych pozyskanych z laboratoryjnej instalacji produkcji biogazu obejmująca zawartość azotu i fosforu oraz poziom ChZT.....	69
Tabela 11. Liczebność mikroorganizmów autochtonicznych w cieczach pofermentacyjnych	70
Tabela 12. Wyniki analiz wybranych zanieczyszczeń w odciekach pofermentacyjnych przed inkubacją (wartości dla odcieków surowych, jak w tab. 10) i po 7-dniowej inkubacji z mikroorganizmami autochtonicznymi	72
Tabela 13. Ocena efektywności usuwania związków biogenych i zanieczyszczeń organicznych z odcieków pofermentacyjnych przez biopreparat ZB-01. T0 – początek doświadczenia, T7 – analizy po 7-dniowej inkubacji.....	73
Tabela 14. Ocena efektywności usuwania związków biogenych i zanieczyszczeń organicznych z odcieku A przez wybrane szczepy drożdży	77
Tabela 15. Ocena efektywności usuwania związków biogenych i zanieczyszczeń organicznych z odcieku B przez wybrane szczepy drożdży.....	79
Tabela 16. Ocena efektywności usuwania związków biogenych i zanieczyszczeń organicznych z odcieku C + D przez wybrane szczepy drożdży	82
Tabela 17. Ocena efektywności usuwania związków biogenych i zanieczyszczeń organicznych z odcieku E przez wybrane szczepy drożdży	84

Tabela 18. Charakterystyka cieczy pofermentacyjnej powstałej podczas biometanizacji gnojowicy świńskiej (BSZ)	85
Tabela 19. Wyniki analiz poziomu chemicznego zapotrzebowania tlenu oraz zawartości azotu amonowego, azotu azotanowego i azotynowego podczas testu bioremediacji odcieku BSZ..	87
Tabela 20. Charakterystyka odcieku BB po fermentacji beztlenowej osadów ściekowych w Bielsku-Białej	88
Tabela 21. Charakterystyka odcieku BB po fermentacji beztlenowej osadów ściekowych w Bielsku-Białej: wartości uzyskane dla ścieków surowych (jak w tab. 20) i poddanych 7-dniowej inkubacji z bakteriami autochtonicznymi	89
Tabela 22. Charakterystyka odcieku BB poddanego wariantowym procesom mikrobiologicznego oczyszczania	97
Tabela 23. Wartość indeksu osadowego Mohlmana w inkubowanej próbce osadu czynnego (kontrola), w próbce po 7-dniowej inkubacji z odciekiem BB oraz w próbce po 7-dniowej inkubacji z odciekiem BB wstępnie oczyszczonym za pomocą konsorcjum mikroalg ZZT i szczepu <i>Chlorella sorokiniana</i>	101
Tabela 24. Charakterystyka odcieku BB poddanego procesowi dwuetapowego oczyszczania z zastosowaniem konsorcjum mikroalg oraz inkubacji z osadem czynnym	102
Tabela 25. Charakterystyka odcieku KK po fermentacji beztlenowej osadów ściekowych w Krzeszowicach.....	103
Tabela 26. Charakterystyka odcieku KK po fermentacji beztlenowej osadów ściekowych w Krzeszowicach: wartości uzyskane dla ścieków surowych (jak w tab. 25) i poddanych 7-dniowej inkubacji z bakteriami autochtonicznymi	104
Tabela 27. Wartość indeksu osadowego Mohlmana w inkubowanej próbce osadu czynnego (Kontrola) oraz w próbce po 7-dniowej inkubacji z odciekiem KK. Osad czynny dobrze pracujący charakteryzuje się wartością indeksu w granicach 80-120 mL/g s.m.....	111
Tabela 28. Charakterystyka odcieku KK poddanego procesowi oczyszczania przez drożdże <i>Trichosporon</i> sp.	112
Tabela 29. Wyniki oczyszczania odcieku KK przez drożdże <i>Trichosporon</i> sp. w warunkach suplementacji wariantowymi źródłami węgla	115
Tabela 30. Charakterystyka surowych odcieków powstałych w procesie ciemnej fermentacji	116
Tabela 31. Wyniki analiz biologicznego oczyszczania odcieku MP+ przez drożdże <i>Yarrowia lipolytica</i>	123

Tabela 32. Opis cech morfologicznych kolonii poszczególnych izolatów bakterii pozyskanych z odcieków pofermentacyjnych (MP+, MP-, TP+, TP-)	124
Tabela 33. Wyniki identyfikacji wyizolowanych drobnoustrojów metodą MALDI-TOF.....	125
Tabela 34. Wyniki oczyszczania odcieków po fermentacji wodorowej przez drobnoustroje autochtoniczne i wyspecjalizowane konsorcjum mikroorganizmów DFMC.....	130

1. Wstęp

Odnawialne źródła energii (OZE), w obliczu kurczących się zasobów paliw kopalnych i wysokiego poziomu emisji CO₂ do atmosfery, są niezwykle istotną alternatywą dla wytwarzania energii z użyciem paliw kopalnych. Do głównych powodów stosowania odnawialnych źródeł energii należą: potrzeba oszczędzania ograniczonych zasobów energii nieodnawialnej oraz konieczność zmniejszenia emisji gazów cieplarnianych [Keerthana i in. 2022].

Obecnie uznaje się, że jedną z najbardziej ekonomicznie efektywnych i zarazem przyjaznych środowisku technologii wytwarzania energii jest produkcja biogazu [Wieland 2010]. Ponadto, niekwestionowaną zaletą procesów produkcji biogazu jest fakt, iż jako substrat do jego wytwarzania mogą być wykorzystywane uciążliwe dla środowiska odpady m. in. z gospodarstw domowych, osadów pochodzących z oczyszczalni ścieków, odpadów rolniczych oraz odpadów z przemysłu rolno-spożywczego [Berłowska i in. 2017].

Biogaz produkowany jest w wyniku rozkładu biomasy organicznej z wykorzystaniem wyspecjalizowanych konsorcjów mikroorganizmów. Proces przebiega w komorach fermentacyjnych, w warunkach beztlenowych [Kunatsa i Xia 2022]. Skład biogazu zależy od surowców użytych do jego produkcji i składa się głównie z dwutlenku węgla i metanu. Łatwopalny metan jest jego głównym komponentem (50% – 85%) a także źródłem energii [Sindhu i in. 2019]. Często stosowanym podejściem jest oczyszczanie biogazu do czystości jaką powinien charakteryzować się biometan [Antosz i in. 2023].

W ostatnim czasie znacząco rośnie zainteresowanie produkcją i wykorzystywaniem wodoru. Jest on bowiem uważany za jeden z najbardziej ekologicznych nośników energii [Looney 2020; Chatzimarkakis i in. 2021]. Stany Zjednoczone i kraje Unii Europejskiej zobowiązały się do ustanowienia gospodarki energetycznej opartej na H₂ pochodzącym ze zrównoważonych lub odnawialnych źródeł [Departament Energii Stanów USA 2020]. W wyniku spalania wodoru lub wykorzystania go w ogniwie paliwowym wytwarzana jest para wodna [Kadier i in. 2016]. Pozwala to znacząco ograniczyć emisję gazów cieplarnianych oraz powstawanie kwaśnych deszczy [Kozłowski 2016]. Wodór charakteryzuje się ponadto wysoką wartością opałową [Dash i in. 2023].

Istnieje wiele sposobów produkcji biowodoru. Dobrze znanymi metodami jest elektroliza wody, reforming parowy węglowodorów i procesy autotermiczne. Procesy te jednakże nie są opłacalne. Mikrobiologiczna produkcja wodoru w procesie ciemnej fermentacji jest rozwiązaniem przyjaznym dla środowiska i energooszczędnym, które ostatnio zyskało duże zainteresowanie jako sposób skutecznego przekształcania odpadów organicznych w wodór [Hu i in. 2013].

Pomimo niekwestionowanych korzyści płynących z wykorzystywania biogazu i biowodoru, należy mierzyć się z jedną niezwykle istotną kwestią, jaką jest odpowiednie

zagospodarowanie odpadowej pulpy pofermentacyjnej, a w szczególności jej uwodnionej frakcji tzw. cieczy pofermentacyjnej. Skład tych potencjalnie toksycznych odpadów jest zmienny i wysoce uzależniony od zastosowanych substratów [Sindhu i in. 2019]. Na szczególną uwagę zasługuje jednakże wysoka zawartość substancji biogenych, zwłaszcza związków azotu i fosforu, których stężenia niejednokrotnie kilkaset razy przekraczają normy określone prawem. Obecność substancji biogenych w środowisku może powodować niekorzystne zjawiska zarastania zbiorników wodnych, czyli ich eutrofizację, a to z kolei powoduje zmniejszenie bioróżnorodności flory i fauny autochtonicznej [Gilbert 2017].

W prawodawstwie polskim, produkty uboczne powstające w wyniku produkcji beztlenowego rozkładu odpadów zwierzęcych i roślinnych zakwalifikowane są jako odpad [Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9.12.2014 r.]. W związku z powyższym, wprowadzenie cieczy pofermentacyjnych do środowiska wiąże się z koniecznością przedsięwzięcia odpowiednich działań, mających na celu przede wszystkim obniżenie zawartości substancji toksycznych, eliminację substancji biogenych i zmniejszenie obciążenia związkami węgla organicznego.

Przedłożona praca podejmuje problematykę zagospodarowania cieczy pofermentacyjnych powstałych w wyniku produkcji biogazu i biowodoru z wykorzystaniem metod mikrobiologicznych. Do tej pory nie opracowano wystarczająco skutecznych metod oczyszczania ścieków powstających podczas fermentacji metanowej, natomiast w przypadku pofermentu towarzyszącego produkcji biowodoru brak jest w ogóle rzetelnej dokumentacji naukowej, dotyczącej utylizacji powstającej cieczy odpadowej.

W niniejszej pracy wykorzystano specjalistyczne narzędzia powiązane z bioremediacją w oczyszczaniu bardzo specyficznych ścieków pochodzących z biogazowni i modelowych instalacji produkcji biogazu i biowodoru, których charakterystyczną cechą jest duża zawartość biogenów i materii organicznej, stanowiących poważne zagrożenie dla środowiska. Określono toksyczność odcieków wobec mikroorganizmów prokariotycznych i eukariotycznych pochodzących z różnych środowisk, a także względem drobnoustrojów osadu czynnego. Przetestowano wariantowe biotechnologie, których celem jest przyjazne środowisku zagospodarowanie cieczy pofermentacyjnych. Zaproponowano wykorzystanie starannie dobranych mikroorganizmów: bakterii, mikroglonów, drożdży i konsorcjów mikrobiologicznych, których aktywności biochemiczne pozwalają na eliminację zagrożeń wywołanych powstawaniem odpadów poprodukcyjnych biogazu i biowodoru. Przeprowadzone badania pozwolą zdefiniować skład i zakres zmienności cieczy pofermentacyjnych oraz wskazać kierunki i możliwości oczyszczania tego typu odpadów w warunkach przemysłowych. Uzyskanie wyników powinny też przyczynić się do rozwinięcia współpracy ze specjalistami z zakresu produkcji biopaliw, oczyszczalnictwa ścieków przemysłowych, a w końcowym rezultacie do opracowania i wdrożenia najkorzystniejszych rozwiązań technologicznych.

2. Przegląd literatury

2.1 Bioremediacja. Mikrobiologiczne unieszkodliwianie zanieczyszczeń

Wzrastający poziom zanieczyszczeń dostających się do środowiska jest jednym z najpoważniejszych współcześnie występujących problemów ekologicznych [Marchut-Mikołajczyk i in. 2013]. Ksenobiotyki, czyli substancje chemiczne, które pojawiły się w środowisku przyrodniczym w wyniku działalności człowieka, zazwyczaj są szkodliwe dla środowiska oraz mają niekorzystny wpływ na zdrowie człowieka. Skutkami oddziaływania czynników szkodliwych mogą być ubytki na zdrowiu objawiające się zwyrodnieniami tkanek, zaburzeniami rozrodczymi, alergiami i zmianami nowotworowymi [Libudzisz Z. i in. 2013]. Konieczne staje się zatem poszukiwanie skutecznych rozwiązań oczyszczania odpadów przemysłowych, przed ich przedostaniem się do środowiska. Jedną z najbardziej obiecujących strategii efektywnego unieszkodliwiania ksenobiotyków jest wykorzystanie potencjału mikroorganizmów [Marchut-Mikołajczyk i in. 2013].

Drobnoustroje są szeroko rozpowszechnione w biosferze, dzięki wyjątkowej bioróżnorodności rodzajów, gatunków, szczepów, jak również dzięki posiadaniu niezwyklej zdolności do dostosowania swojego metabolizmu do zmiennych warunków środowiskowych. Niemal nieograniczony potencjał do przyswajania różnorodnych składników odżywczych pozwala na ich szerokie wykorzystanie w bioremediacji zanieczyszczeń [Waraczewska i in. 2018].

Bioremediacja polega na degradacji, usuwaniu, konwersji, immobilizacji lub detoksykacji różnych substancji chemicznych i odpadów fizycznych ze środowiska dzięki działaniu bakterii, grzybów, glonów lub roślin [Libudzisz i in. 2013]. Drobnoustroje zaangażowane są w ten proces poprzez swoje, w wielu przypadkach rzadkie i unikatowe, szlaki enzymatyczne, dzięki którym ułatwiają przebieg reakcji biochemicznych prowadzących do biologicznej transformacji lub całkowitego rozkładu niepożądanych zanieczyszczeń. Bioremediacja zanieczyszczeń może przebiegać wydajnie tylko w określonych warunkach, umożliwiających wytworzenie energii oraz pozyskanie składników odżywczych do budowy komórek potomnych. Skuteczność bioremediacji zależy od wielu czynników: w tym charakteru chemicznego i stężenia zanieczyszczeń, ich biodostępności, a także właściwości fizykochemicznych środowiska [El Fantroussi i Agathos 2005; Patel i in. 2022].

W praktyce środowiskowej wciąż duży udział mają metody fizyko-chemiczne, które opierają się na zabiegach obejmujących mechaniczne usuwanie i magazynowanie zanieczyszczeń występujących w skażonym środowisku, jak również na technikach chemicznych (utlenianie i redukcja, solidyfikacja, przemywanie, odmywanie), termicznych (odparowanie, zeszklenie) i fizycznych (izolacja, elektrooczyszczanie) [Rolka i Szostek 2016]. W przeciwieństwie do wymienionych metod konwencjonalnych, bioremediacja jest

wysoce zorganizowanym procesem, którego przewagą nad innymi metodami są: wysoka efektywność, wzrost bioróżnorodności po likwidacji zanieczyszczeń oraz zapobieganie dalszej ich kumulacji [Demnerova i in. 2005].

Wyłączając niezależnie definiowane i szeroko opisywane procesy fitoremediacji [Antonkiewicz i Gworek 2023; Augustynowicz i in. 2013; Ashraf i in. 2010; Tsao i in. 2003; Favas i in. 2014; Ali i in. 2013; Anjum i in. 2013; Mrozik i Piotrowska-Seget 2009] hydrofitowe oczyszczanie wód i ścieków [Gajewska i in. 2010], do mikrobiologicznych bioremediatorów czyli drobnoustrojów o specyficznych właściwościach fizjologicznych i biochemicznych, odpowiedzialnych za prowadzenie procesu remediacji zanieczyszczonych środowisk, należą głównie bakterie, grzyby i archeony [Strong i Burgess 2008; Krzmarzick i in. 2018]. Potencjał zastosowań metod bioremediacji jest ogromny i poszczególne rozwiązania pozwalają na oczyszczanie skażonych gleb, osadów dennych i przemysłowych oraz wód [Waraczewska i in. 2018; Supel i in. 2013; Mrozik i Piotrowska-Seget 2009; Maj i Koszelnik 2016].

2.1.1 Bioremediacja jako korzystna alternatywa dla innych metod oczyszczania

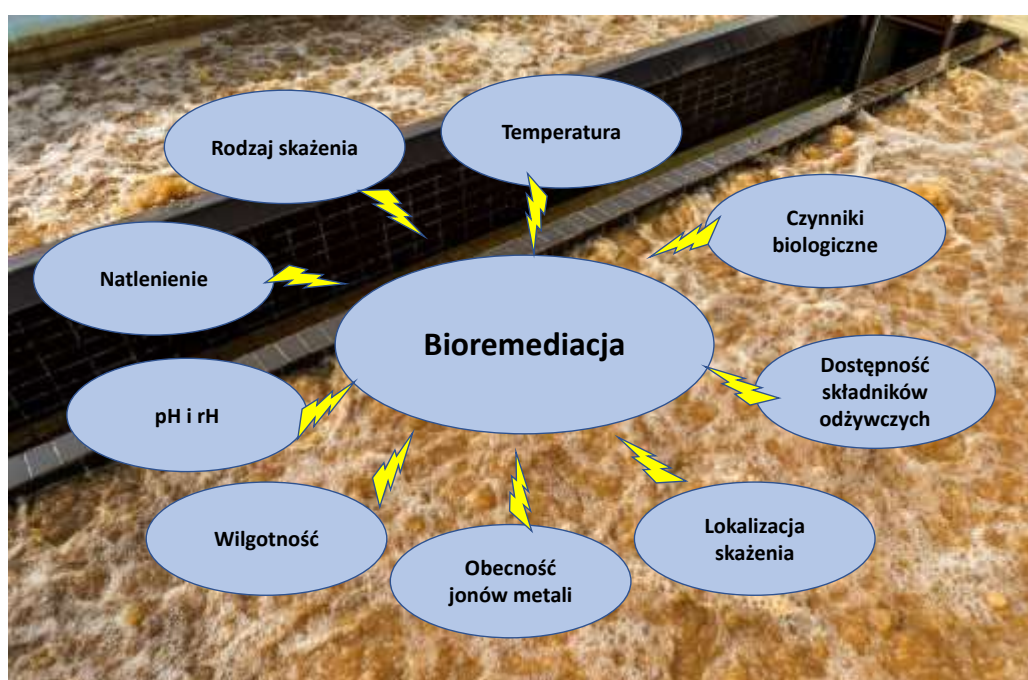
Wśród korzyści wynikających ze stosowania metod biologicznej remediacji z użyciem drobnoustrojów oraz ich konsorcjów wymienić można następujące cechy:

- Jest to proces naturalny. Odpowiednio wyselekcjonowane drobnoustroje, zdolne do degradacji danego zanieczyszczenia mogą zwiększyć swoją liczebność wówczas, gdy zanieczyszczenie jest obecne w ich środowisku. Kiedy zanieczyszczenie ulega degradacji, populacja mikroorganizmów również maleje. Pozostałości po zakończeniu procesu to zwykle nieszkodliwe produkty, w tym woda, dwutlenek węgla i biomasa komórkowa [Madison 2023].
- Często możliwe jest przeprowadzenie procesu oczyszczania *in situ*. Eliminuje to konieczność wywożenia dużej ilości odpadów poza obszar, na którym nastąpiło zanieczyszczenie, co zmniejsza potencjalne zagrożenia dla zdrowia ludzkiego i środowiska, które mogą powstać podczas transportu, a następnie na skutek pojawiających się odcieków i migracji skażeń w nowym miejscu zdeponowania [Madison 2023].
- Jest procesem efektywnym ekonomicznie, ponieważ wymaga mniejszego nakładu kosztów i energii niż inne, konwencjonalne technologie stosowane do oczyszczania odpadów niebezpiecznych. Szczególne korzyści związane są z projektami oczyszczania miejsc zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi [Namkoong i in. 2022].
- Jest to metoda prosta, nieinwazyjna, ekologiczna i łatwa w implementacji. Ponadto, umożliwia prowadzenie biologicznej rekultywacji i rewitalizacji ekosystemów obciążonych wieloma rodzajami zanieczyszczeń [Patel i in. 2022].

2.1.2 Czynniki warunkujące skuteczność procesu bioremediacji

Bioremediacja może być skuteczna tylko tam, gdzie warunki środowiskowe pozwalają na wzrost i aktywność drobnoustrojów, a możliwość jej zastosowania zazwyczaj wiąże się z zabiegami optymalizującymi parametry środowiskowe tak, aby umożliwić szybszy wzrost drobnoustrojów i uzyskać jak najwyższy stopień degradacji zanieczyszczeń.

Sterowanie i optymalizacja procesów bioremediacji jest złożonym zagadnieniem, na które składa się wiele czynników biologicznych, a także biotycznych i abiotycznych czynników środowiskowych (ryc. 1). Obejmują one: występowanie populacji drobnoustrojów zdolnej do rozkładu zanieczyszczeń, stężenie i dostępność zanieczyszczeń dla metabolizujących komórek, jak również czynniki środowiskowe, takie jak właściwości zanieczyszczonego mikrośrodowiska (np. rodzaj gleby, wody, ścieków, osadów), temperatura, pH, potencjał redoks rH, siła jonowa, obecność tlenu lub innych akceptorów elektronów oraz składników odżywczych i kometabolitów [Adams i in. 2015].



Ryc. 1. Czynniki wpływające na proces bioremediacji [opracowanie własne]

Szybkość biologicznej degradacji zanieczyszczeń jest często zależna od początkowej liczebności organizmów zdolnych do metabolizowania danego zanieczyszczenia. Istotnym

aspektem jest również poziom ekspresji i aktywności enzymów wytwarzanych przez komórki drobnoustrojów, które są odpowiedzialne za przekształcanie ksenobiotyków [Supel 2013].

Ponadto do głównych czynników biologicznych bioremediacji zaliczyć należy: występowanie i częstość mutacji, obecność ruchomych elementów genetycznych (MGE ang. *mobile genetic element*), horyzontalny transfer genów (HGT ang. *horizontal gene transfer*), oraz interakcje (konkurencja, sukcesja i drapieżnictwo) pomiędzy poszczególnymi składnikami aktywnej populacji drobnoustrojów, a także wielkość i skład (bioróżnorodność) działającej biocenozy [Madhavi i Mohini 2012].

Przed przystąpieniem do procesu bioremediacji należy scharakteryzować wielkość i zasięg obszarowy zanieczyszczenia. Wysokie stężenia niektórych zanieczyszczeń o charakterze toksycznym mogą mieć negatywne skutki dla mikroorganizmów i spowalniać proces bioremediacji. Stopień i mechanizmy toksyczności różnią się w zależności od konkretnych substancji toksycznych, ich koncentracji lokalnej i rodzaju narażonych na nie drobnoustrojów [Madhavi i Mohini 2012].

Praca ta powinna obejmować co najmniej następujące czynniki: pełne określenie topologii: poziomego i pionowego zasięgu zanieczyszczenia, wyszczególnienie parametrów i miejsc pobierania próbek wraz z uzasadnieniem ich wyboru, opisanie metod, które mają być użyte do pobrania próbek i analiz, jakie należy wykonać [Kaszycki i in. 2013; Supel i in. 2013].

Spośród czynników fizycznych najważniejszym czynnikiem decydującym o przeżywalności aktywnych szczepów oraz ich potencjale metabolicznym i fizjologicznym jest temperatura [Das i Chandran 2011; Brzeszcz 2016]. W chłodnych środowiskach, takich jak Arktyka, degradacja ropy w wyniku naturalnych procesów jest bardzo powolna, co jest związane z niską aktywnością drobnoustrojów. Temperatura wody poniżej zera w tym regionie powoduje zamknięcie kanałów transportowych w komórkach lub może nawet skutkować zamrożeniem cytoplazmy, czyniąc w ten sposób większość drobnoustrojów oleofilowych nieaktywnymi metabolicznie [Macaulay 2014]. Ponadto, enzymy katalizujące poszczególne etapy biodegradacji ksenobiotyków charakteryzują się optymalną temperaturą działania. Tak więc, ogólny poziom aktywności drobnoustrojów wzrasta wraz z temperaturą i osiąga maksimum w temperaturze optymalnej [Bisswanger 2014].

Do prawidłowego rozwoju mikroorganizmy potrzebują odpowiedniej wilgotności, potencjału redoks oraz pH. Wilgotność wpływa na tempo metabolizmu zanieczyszczeń, ponieważ determinuje rodzaj i ilość dostępnych rozpuszczalnych materiałów oraz ciśnienie osmotyczne. Odczyn środowiska i potencjał redoks mają z kolei wpływ na aktywność metaboliczną drobnoustrojów, przez co w znacznym stopniu modyfikują procesy usuwania zanieczyszczeń [Liu S. i in. 2019]. Biodegradacja może zachodzić w szerokim zakresie pH, jednak wartości w zakresie pH=6,5 – 8,5 są na ogół uważane za optymalne dla biodegradacji w większości przypadków [Podsiadło i Krzyśko–Łupicka 2013].

Pomimo, iż jony metali takich jak K, Ca, Mg, Na, niezbędne są do prawidłowego funkcjonowania drobnoustrojów, zbyt wysokie ich stężenia mogą hamować aktywność metaboliczną komórek poprzez wywoływanie negatywnego wpływu na funkcjonowanie i syntezę białek oraz ich wiązanie do DNA [Szatmari i in. 2020].

Degradacja biologiczna może odbywać się w warunkach tlenowych i beztlenowych, jednakże tlen jest najkorzystniejszym końcowym akceptorem elektronów w procesach oddechowych, a zatem dostępność tlenu w większości przypadków wzmagają metabolizm ksenobiotyków [Macaulay i in. 2014; Rychlicki i Fąfara 2006; Kaszycki i in. 2013].

W celu zwiększenia wydajności bioremediacji, często stosuje się dodatek składników odżywczych (suplementacja) z zamierzeniem poprawy równowagi składników niezbędnych do wzrostu i zwiększania liczebności drobnoustrojów, co przekłada się na szybkość i skuteczność biologicznego rozkładu zanieczyszczeń. Równoważenie proporcji składników odżywczych, a zwłaszcza dostarczanie niezbędnych substancji biogenych takich jak N i P, może poprawić efektywność biodegradacji poprzez optymalizację stosunku C: N: P. Strategia uzupełniania brakujących składników pokarmowych do optymalnych ilości jest jednym z zabiegów biostymulacji, bardzo korzystnie wpływających na aktywność metaboliczną komórek, prowadząc do zwiększenia tempa biodegradacji [Couto i in. 2014].

2.1.3 Bioremediacja w praktyce środowiskowej – rodzaje stosowanych technologii

Bioremediacja obejmuje różne rodzaje technologii z wykorzystaniem drobnoustrojów. Jeden z proponowanych podziałów obejmuje trzy kategorie stosowanych metod: bioremediacji naturalną, biostymulację i bioaugmentację.

Naturalna bioremediacja zwana też bioatenuacją to eliminacja zanieczyszczeń z otoczenia bez integracji człowieka. Wykorzystywane są naturalnie przebiegające w środowisku procesy, które mogą obejmować degradację biologiczną (biodegradacja tlenowa i beztlenowa, przyswajanie związków przez rośliny i zwierzęta), zjawiska fizyczne (dyspersja, rozcieńczanie, dyfuzja, ulatnianie się, sorpcja/desorpcja) oraz reakcje chemiczne (wymiana jonowa, tworzenie kompleksów, transformacja abiotyczna). Wadą tego procesu jest często długi czas trwania i niska wydajność oczyszczania [Waraczewska i in. 2018].

Biostymulacja to rodzaj bioremediacji opierający się stworzeniu korzystnych warunków wzrostu i/lub ujawnienia pożądanej cechy. Istnieje wiele sposobów biostymulacji. Jeden z nich polega na stymulowaniu aktywności rodzimych mikroorganizmów (drobnoustrojów autochtonicznych). Po pierwsze, poprzez dostarczanie składników odżywczych, stymulatorów wzrostu i pierwiastków śladowych. Po drugie, zapewniając inne wymagania środowiskowe, takie jak odpowiednie pH, temperatura i tlen, aby przyspieszyć tempo i uruchomić odpowiednie szlaki metaboliczne [Adams i in. 2015]. Kolejne polegają m. in. na aktywacji szlaków metabolicznych (indukcja/represja genów), kometabolizmie

(podanie kometabolitu), zwiększeniu oporności na ksenobiotyk (adaptacja), wymuszaniu pionowego przepływu wody wraz z nutrientami i powietrzem, zapewnieniu dostępu powietrza (*bioventing*, aktywna aeracja), zabiegach agrotechnicznych (przeorywanie) [Rychlicki i Fąfara 2006].

Bioaugmentacja z kolei polega na wprowadzaniu do zanieczyszczonego miejsca konsorcjów mikroorganizmów allochtonicznych bądź ich pojedynczych szczepów w celu zwiększenia ogólnej puli mikroorganizmów [Cycoń i in. 2017]. Bioaugmentacja stosowana jest gdy bioróżnorodność oraz liczba mikroorganizmów zdolnych do degradacji zanieczyszczenia jest zbyt mała bądź gdy toksyczność ksenobiotyków jest zbyt duża w stosunku do drobnoustrojów rodzimych. Dodawane drobnoustroje (allochtoniczne) powinny być zdolne do szybkiego działania i tolerujące obecność potencjalnie toksycznych ksenobiotyków oraz zmian środowiska [Mrozik 2016]. Powinny też charakteryzować się niskim kosztem uzyskania, aby ich zastosowanie jako *inoculów* (szczepionek mikrobiologicznych) było możliwe z ekonomicznego punktu widzenia. Metoda ta z powodzeniem jest wykorzystywana do bioremediacji różnorodnych zanieczyszczeń [Dellagnezze i in. 2016; Kaszycki i in 2013; Kavamura i in. 2010; Hussain i in. 2017; Rychlicki i Fąfara 2006; Brzeszcz 2016; El Fantroussi i Agathos 2005].

Opisane wyżej metody prowadzą do eliminacji zanieczyszczeń na skutek wydajnej ich biodegradacji. Jest to bardzo owocna i interesująca opcja biologicznej rekultywacji i likwidacji zanieczyszczeń środowiskowych w wyniku aktywności mikrobiologicznej. Szybkość degradacji niepożądanych substancji odpadowych, często niebezpiecznych i toksycznych, zależy od potencjału rodzimych mikroorganizmów, zaopatrzenia w niezbędne składniki pokarmowe oraz zewnętrznych warunków abiotycznych. Podczas podejmowania prac rewitalizacyjnych i rekultywacyjnych na obszarach zdegradowanych antropogenicznie, dobór odpowiedniej metody: pozostawienie skażeń do spontanicznej bioremediacji naturalnej lub też zastosowanie biostymulacji albo bioaugmentacji zależy od stopnia zanieczyszczenia, rodzaju ksenobiotyków, ich podatności na biodegradację warunkującej tempo rozkładu oraz od jakości rodzimej mikrobioty.

2.2 Zanieczyszczenia wód, eutrofizacja i czynniki zagrożeń w kontekście działalności przemysłowej

Zanieczyszczenie wód obejmuje wszystkie niekorzystne zmiany ich właściwości fizycznych, chemicznych i biologicznych, które spowodowane są wprowadzeniem nadmiernych ilości substancji organicznych i nieorganicznych. Za podstawowe źródło zanieczyszczeń polskich wód uznaje się ścieki przemysłowe, miejskie ścieki komunalne, a także spływy powierzchniowe z terenów nieskanalizowanych i rolniczych [Miksch i Sikora 2010; Raport NIK 2021].

Na szczególną uwagę zasługują ścieki przemysłowe, ponieważ ponad 83% ich ogólnej odprowadzanej objętości powstaje jako wynik działalności zakładów usługowych i produkcyjnych [Wałęga i in. 2009]. W konsekwencji aktywności przemysłowej, do wód przedostaje się szereg różnorodnych, niejednokrotnie toksycznych zanieczyszczeń. Ich rodzaj, a co za tym idzie zagrożenia środowiskowe, zależą głównie od specyfiki pracy przedsiębiorstwa, z którego pochodzą [Cui i in. 2023].

Ścieki przemysłowe zawierają liczne zanieczyszczenia. Obejmują one najczęściej materię organiczną (w tym kwasy organiczne), metale ciężkie, związki biogenne, detergenty, surfaktanty czy wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA). Na szczególną uwagę zasługują związki azotu i fosforu (substancje biogenne), które, same powodując zagrożenia środowiskowe, mają jednocześnie istotny wpływ na przebieg procesu oczyszczania. Związki te są zazwyczaj dobrze rozpuszczalne, a więc ich usuwanie poprzez filtrowanie, sedymentację, flotację czy inne techniki separacji substancji stałych od cieczy jest nieefektywne i nieekonomiczne [Henze 2008; Zhou 2023].

Obecność substancji biogennych w środowisku może powodować zarastanie zbiorników wodnych, czyli ich eutrofizację, a to z kolei powoduje zmniejszenie bioróżnorodności flory i fauny autochtonicznej [Gilbert 2017]. W myśl ustawy *Prawo wodne* [Ustawa z 20 lipca 2017 r.] eutrofizację definiuje się jako: „wzbogacanie wód biogenami, w szczególności związkami azotu lub fosforu, powodującymi przyspieszony wzrost glonów oraz wyższych form życia roślinnego, w wyniku którego następują niepożądane zakłócenia biologicznych stosunków w środowisku wodnym oraz pogorszenie jakości tych wód”.

Wody eutroficzne, a zwłaszcza jeziora (wody stojące) ulegają degradacji. Wysokie stężenia soli mineralnych, które prowadzą do ekspansji glonów i powstawania mułu dennego, sprawiają, że jezioro stopniowo wypłyca się, a po pewnym czasie przekształca w torfowisko i następnie ulega zanikowi. Ze względu na szybsze obumieranie tych środowisk wodnych, jeziora eutroficzne na terenie Unii Europejskiej uznawane są za siedliska przyrodnicze objęte ochroną. Taki stan wód powoduje też, że roślinność jezior eutroficznych jest uboga.





Ryc. 2. Przykłady zbiorników wód stojących z widocznym skutkiem eutrofizacji
a. – c. Fot. własna, miejscowość Sieborowice, pow. krakowski
d. Źródło: Alexandr Trubetskoy [CC BY-SA 3.0]

Obszary aktywności gospodarczej, których działalność skutkuje powstawaniem eutrofizowanych ścieków to, przede wszystkim, przemysł cukierniczy [Khakimova 2022], browarniczy [Song i in. 2020], mleczarski [Hajduk i in. 2016; Hu i in. 2021] oraz mięsny [Kwarciak-Kozłowska i in. 2011; Tusseau-Vuillemin i in. 2001].

Poważnym zagrożeniem eutrofizacją środowisk są również odpady, które powstają w wyniku produkcji biogazu metodą fermentacji beztlenowej substancji organicznych. Biometanizacji podlegać mogą zarówno produkty uboczne wcześniej wymienionych gałęzi przemysłu, jak i wiele innych surowców, które są pochodzenia przemysłowego, rolniczego (np. odpady biomasy, odpady produkcji roślinnej, odchody zwierzęce) czy komunalnego (odpady z terenów zielonych, odpady kuchenne, osady ściekowe) [Ignatowicz 2023]. Biotransformacja substratów na drodze mikrobiologicznego procesu wytwarzania metanu skutkuje powstaniem pozostałości, w skład których wchodzi między innymi związki azotu i fosforu [Kubar 2022]. Wymienione biogeny dominują w cieczy pofermentacyjnej, powstałej w wyniku separacji frakcji ciekłej od frakcji stałej z masy (pulpy) pozostającej po fermentacji metanowej [Cieślik i in. 2014].

Kolejnym zagrożeniem są ciecze pofermentacyjne powstałe w procesie produkcji biowodoru metodą tzw. ciemniej fermentacji. Główne niebezpieczeństwo wiąże się w tym przypadku z obecnością nadmiarowego fosforu, którego zawartość może przekraczać nawet 1500 mg/L [Cieciura-Włoch i Borowski 2019] przy normie dla ścieków oczyszczonych

możliwych do wprowadzenia do środowiska wynoszącej 3 mg/L [Rozporządzenie Ministra Gospodarki Morskiej i Żeglugi Śródlądowej z dnia 12 lipca 2019].

2.3 Odnawialne źródła energii: perspektywy, regulacje prawne i problemy środowiskowe

Paliwa kopalne wciąż pozostają głównym źródłem energii [Looney 2020]. Jednakże odnawialne źródła energii (OZE), w obliczu ograniczonych zasobów paliw konwencjonalnych i wysokiego poziomu emisji CO₂ do atmosfery, są niezwykle istotną alternatywą dla wytwarzania energii.

Do głównych powodów stosowania OZE należą: oszczędność ograniczonych zasobów energii nieodnawialnej oraz konieczność zmniejszenia emisji CO₂ do atmosfery [Keerthana i in. 2022]. Wychodząc naprzeciw narastającemu problemom cywilizacyjnym, Unia Europejska wprowadziła w 2014 roku pakiet energetyczno-klimatyczny, a wszystkie zrzeszone kraje zgodziły się spełnić zakładane cele, kolejno do 2030 i 2050 roku. W myśl uzgodnionego pakietu, Unia Europejska zakłada ograniczenie emisji gazów cieplarnianych o co najmniej 55% do 2030r., osiągnięcie neutralności klimatycznej do 2050r., z jednoczesnym promowaniem tworzenia zielonych miejsc pracy i naciskiem na dalsze ograniczanie emisji gazów cieplarnianych przy jednoczesnym zrównoważonym rozwoju gospodarczym. Na liście planowanych działań znajduje się również dążenie do ograniczenia wzrostu globalnej temperatury do 1,5°C w celu uniknięcia najpoważniejszych konsekwencji zmian klimatu. Podobne podejście obrały Stany Zjednoczone, ogłaszając w 2021 roku cel polegający na osiągnięciu 50 – 52% redukcji zanieczyszczeń gazami cieplarnianymi w całej gospodarce w 2030 r. w stosunku do 2005 r. [European Green Deal 2020].

W związku z powyższym, w ostatnich latach nastąpiła intensyfikacja działań zmierzających do rozwoju gałęzi przemysłu bezpośrednio powiązanych z OZE.

Odnawialne źródła energii cechuje niewyczerpalność i ogólnodostępność. Ustawa Prawo Energetyczne określa OZE jako „źródła wykorzystujące w procesie przetwarzania energię wiatru, promieniowania słonecznego, geotermalną, fal, prądów i pływów morskich, spadku rzek oraz energię pozyskiwaną z biomasy, biogazu wysypiskowego, a także z biogazu powstałego w procesach odprowadzania lub oczyszczania ścieków albo rozkładu składowanych szczątków roślinnych i zwierzęcych” [Ustawa – Prawo energetyczne 1997].

Czerpanie potencjału energetycznego ze słońca, wiatru czy wody to najbardziej znane i powszechne metody pozyskiwania energii, zwłaszcza ciepłej. Pomimo wielu zalet płynących z wykorzystywania wymienionych źródeł, często okazują się one nieekonomiczne i efektywne jedynie w ściśle określonych warunkach atmosferycznych, klimatycznych i geograficznych [Oluwaseun i in. 2018; Lalak i in. 2014]. Ostatnio dominuje pogląd, że jedną z najbardziej energetycznie korzystnych i zarazem przyjaznych środowisku i bezpiecznych

technologii produkcji bioenergii jest produkcja biogazu [Wieland 2010]. Ponadto, niekwestionowaną zaletą procesów produkcji biogazu jest fakt, iż jako substrat do jego wytwarzania mogą być wykorzystywane uciążliwe dla środowiska odpady [Berłowska i in. 2017].

Zgodnie z danymi Agencji Rynku Rolnego ilość substratu zużytego jedynie do produkcji biogazu rolniczego w 2021 r. wyniosła 4 912 454,6 Mg [Agencja Rynku Rolnego 2021] a łączna moc 346 funkcjonujących w Polsce w roku 2021 biogazowni wyniosła 257,3 MW [Urząd Regulacji Energetyki 2021]. Pozostałe kraje Unii Europejskiej również intensywnie pracują nad zwiększeniem skali produkcji biogazu co zaowocowało powstaniem ponad 20 tysięcy instalacji produkujących ten rodzaj nośnika energii [*European Biogas Association* 2022].

2.4 Biogaz i jego wartość energetyczna

2.4.1 Fermentacja metanowa i produkcja biogazu

Biogaz powstaje w wyniku rozkładu biomasy organicznej z wykorzystaniem wyspecjalizowanych konsorcjów drobnoustrojów. Proces przebiega w komorach fermentacyjnych, w warunkach beztlenowych [Buraczewski 1989; Kunatsa i Xia 2022].

Produkcja biogazu obejmuje cztery etapy: hydrolizę; kwasogenezę; octanogenezę oraz metanogenezę. W pierwszej fazie zachodzi rozkład materii organicznej (białek, tłuszczów, węglowodanów) na mniejsze cząsteczki (aminokwasy, cukry proste, alkohole wielowodorotlenowe i kwasy tłuszczowe). W procesie tym biorą udział enzymy zewnątrzkomórkowe wytwarzane przez bakterie zaangażowane w ten etap. Podczas kwasogenezy powstają: alkohol metylowy, lotne kwasy tłuszczowe, etanol, dwutlenek węgla, wodór oraz octany. Kwas octowy i mrówkowy, jak również metanol, dwutlenek węgla i wodór mogą już po tym etapie zostać wykorzystane w procesie metanogenezy przez bakterie metanowe. Bakterie acetogenne z kolei przetwarzają lotne kwasy tłuszczowe i etanol do dwutlenku węgla i wodoru w następnym etapie czyli z octanogenezy [Asgari i in. 2011].

Szczegółowe aspekty bioprocessu wytwarzania biogazu zostały opisane w dostępnej literaturze przedmiotu, w tym bardzo złożone przemiany biochemiczne [Buraczewski 1989]. Sama produkcja została już wdrożona i optymalizowana w wielu rozwiązaniach przemysłowych, dlatego też powyżej podano jedynie główne zagadnienia związane z mechanizmami biometanizacji [Kwaśny i in. 2012; Jabłoński i in. 2014; Mazowiecka Agencja Energetyczna sp. z o. o. 2009].

2.4.2 Substraty do produkcji biogazu

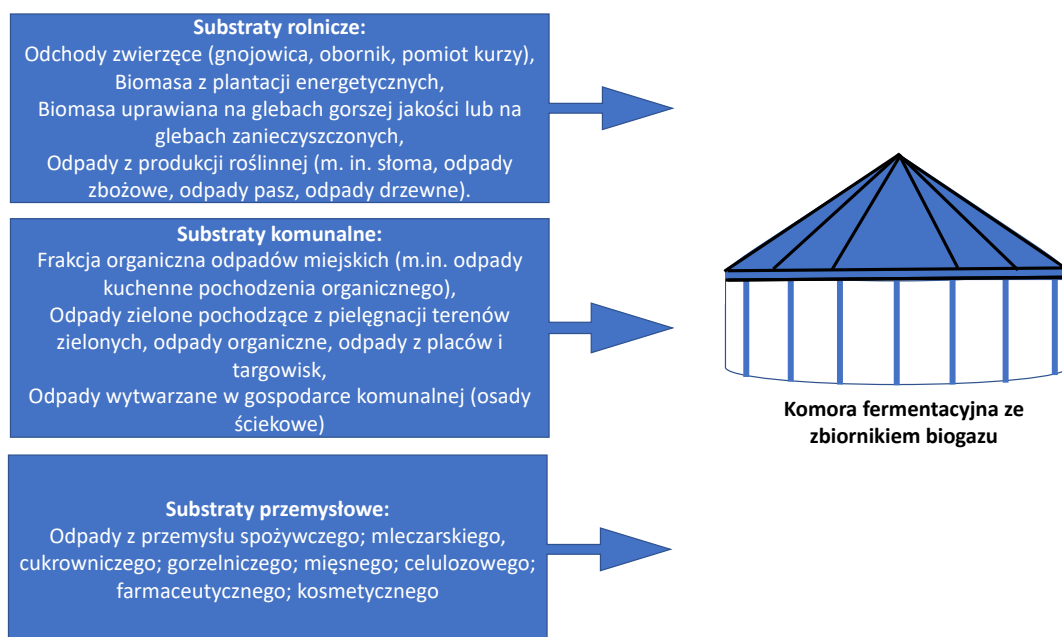
Do produkcji biogazu wykorzystuje się różnorodne substraty organiczne, które można podzielić na trzy grupy: rolnicze, komunalne oraz przemysłowe (ryc. 2) [Cukrowski i Oniszek-Popławska 2010; Keerthana 2022].

Skład biogazu zależy od surowców użytych do jego produkcji i składa się głównie z dwutlenku węgla i metanu. Łatwopalny metan jest jego głównym komponentem (50%–85%) a także źródłem energii [Sindhu i in. 2019]. W mniejszych ilościach występują azot, tlen, siarkowodór czy amoniak [Kwaśny 2012]. Szczegółowy skład biogazu podano w tabeli nr 1. Wartość opałowa biogazu jest zależna od zawartości metanu, mieści się w zakresie 17 – 25 MJ/m³ (1 m³ biogazu odpowiada energii zawartej w 0,93 m³ gazu ziemnego lub 1,25 kg węgla) [Rejman-Burzyńska i in. 2013].

Tabela 1. Skład chemiczny biogazu [Kwaśny J. i in. 2012]

Składnik	Jednostka	Odpady z gospodarstw domowych	Osady z oczyszczalni ścieków	Odpady rolnicze	Odpady z przemysłu rolno-spożywczego
CH₄	[%] obj.	50 – 60	60 – 75	60 – 75	68
CO₂		34 – 38	19 – 33	19 – 33	26
N₂		0 – 5	0 – 1	0 – 1	-
O₂		0 – 1	< 0,5	< 0,5	-
H₂O	[%] obj. (w 40°C)	6	6	6	6
H₂S	[mg/m ³]	100 – 900	1000 – 4000	3000 – 10000	100
NH₃		-	-	50 – 100	400
Związki aromatyczne		0 – 200	-	-	-
Związki chlorowcoorganiczne lub fluoroorganiczne		100 – 800	-	-	-

Często w procesach fermentacji metanowej wykorzystywany jest więcej niż jeden rodzaj substratu jednocześnie. Podejście to jest korzystne zarówno z ekonomicznego, jak i ekologicznego punktu widzenia. Wprowadzenie ko-substratu organicznego stanowi dodatkowe źródło węgla organicznego korzystnie wpływając na wydajność bioproduktu, a co za tym idzie zwiększa poziom produkcji biogazu [Kalemba i Barbusiński 2016].



Ryc. 3. Podział substratów wykorzystywanych do produkcji biogazu [opracowanie własne]

2.4.3 Masa pofermentacyjna, metody jej zagospodarowania i potrzeba oczyszczania odcieków

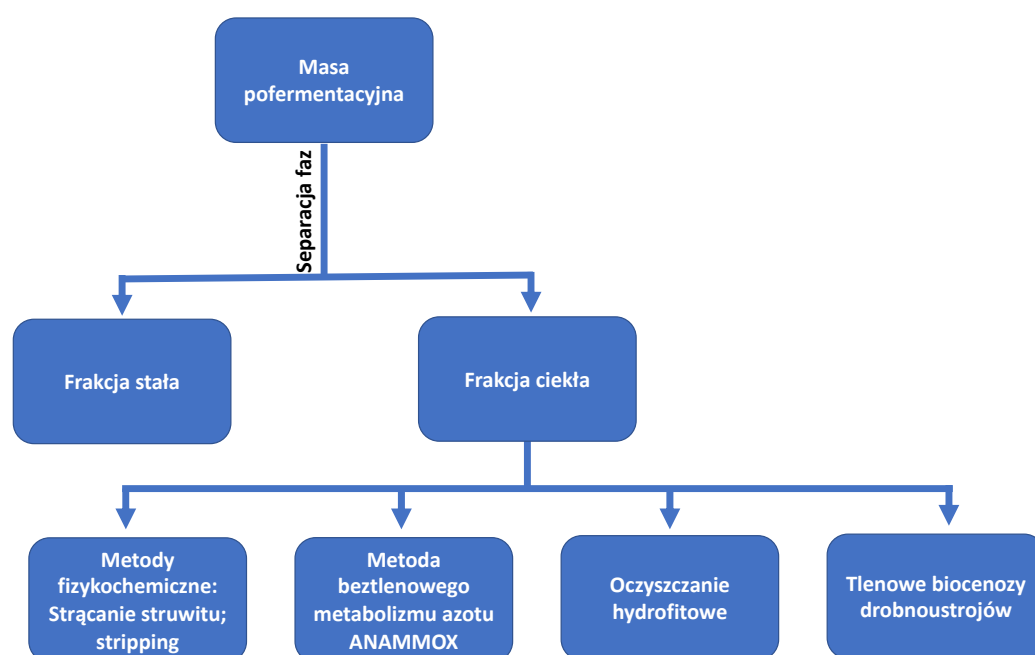
Pomimo niekwestionowanych korzyści płynących z produkcji i wykorzystywania biogazu, należy zmierzyć się z niezwykle istotną kwestią, jaką jest powstawanie odpadowej pulpy pofermentacyjnej, zwanej też pofermentem, wymagającej odpowiedniego zagospodarowania. W polskim prawie produkty uboczne powstałe w wyniku produkcji biogazu nie są zakwalifikowane jako nawóz, ale traktowane są jako odpad. Zgodnie z katalogiem odpadów zaliczane są do pozycji 19 06 05, czyli „ciecze z beztlenowego rozkładu odpadów zwierzęcych i roślinnych” oraz 19 06 06 – "przefermentowane odpady z beztlenowego rozkładu odpadów roślinnych i zwierzęcych" [Dz.U. z 2014 poz.1923].

Zgodnie z założeniem, że biogazowania o mocy 1 MW wytwarza rocznie do 30 000 t pofermentu [Makara 2017], w wyniku funkcjonowania biogazowni w Polsce powstaje ok. 7,7 mln Mg masy pofermentacyjnej rocznie. Skład pofermentu różni się w zależności od substratu użytego do produkcji biogazu. Zazwyczaj jednak charakteryzuje się on wysoką zawartością związków azotu (głównie azotu amonowego), fosforu oraz wyjątkowo niekorzystnym stosunkiem C:N wynoszącym często poniżej 1 (optymalny stosunek mieści to ok. 20) [Sharma i Bhatii 2022].

Podczas zabiegów związanych z utylizacją masy pofermentacyjnej, częstym podejściem jest rozdzielanie pulpy na frakcję stałą i ciekłą, a następnie ich niezależne

zagospodarowanie. Frakcja stała zazwyczaj jest suszona i wykorzystywana jako nawóz bądź spalana [Tambone i in. 2017]. Frakcja ciekła również może zostać wykorzystana jako nawóz, ale zwłaszcza w ostatnich latach stało się to utrudnione, gdyż wiąże się z wieloma restrykcjami [Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 20 stycznia 2015 r.] i możliwością jedynie sezonowego użytkowania [Ustawa z dnia 20 lipca 2017 r. Prawo wodne]. Należy tu podkreślić, że w wyniku separacji faz, 87% azotu i 71% fosforu przechodzi do frakcji ciekłej [Tambone i in. 2017], co sprawia, że ciecz pofermentacyjna wprowadzeniu do środowiska może powodować eutrofizację okolicznych zbiorników wodnych, a co za tym idzie stanowić poważne zagrożenie dla zasiedlającej je flory i fauny [Gilbert 2017; Sobolewska i in. 2022]. Ponadto, ciecz pofermentacyjna najczęściej nie może również zostać wprowadzona bezpośrednio do systemu oczyszczania ścieków ze względu na jej potencjalną toksyczność względem osadu czynnego [Hałat-Łaś i in. 2018].

Istnieją cztery dominujące podejścia oczyszczania ścieków wysoko obciążonych biogenami, powstających w przemyśle produkcji biogazu (ryc. 4):



Ryc. 4. Metody oczyszczania frakcji ciekłej masy pofermentacyjnej [opracowanie własne]

- **metody fizykochemiczne**, obejmujące strącanie nierozpuszczalnego fosforanu magnezowo – amonowego (struwitu) oraz tzw. *stripping* – odpędzanie gazowego amoniaku otrzymanego po radykalnej alkalizacji ścieku. Skuteczność odpędzania amoniaku i strącania struwitu zależy od wartości temperatury i pH. Stosowanie dużych ilości reagentów niezbędnych do utrzymania odpowiedniej wartości pH oraz wysoki poziom zużycia energii sprawia, że usuwanie w ten sposób azotu i fosforu pociąga za sobą wysokie koszty [Urbanowska i in. 2019].
- **metoda ANR**, oparta na beztlenowym metabolizmie azotu *ANAMMOX* [Wu i in. 2020]. Proces beztlenowego utleniania amoniaku możliwy jest dzięki aktywności wyspecjalizowanych beztlenowców z grupy *Candidatus kuenenia*, *Candidatus brocadia*, *Candidatus anammoxoglobus*, *Candidatus anammoximicrobium*, *Candidatus jettenia* oraz *Candidatus scalindua*. Główną wadą tego podejścia jest niski przyrost biomasy stosowanych w procesie drobnoustrojów [Kubacki i Borowski 2014; Zielińska i in. 2018].
- **oczyszczanie hydrofitowe**, wykorzystujące aktywności roślin fotosyntetyzujących. Zgodnie z tą metodą, poferment kierowany jest na złoża obsadzone odpowiednio dobranymi gatunkami roślin. Rozwiązanie to jednak wciąż jest na etapie prac badawczych [Kowalczyk-Juśko i Szymańska 2015].
- wykorzystanie **tlenowych biocenz drobnoustrojów**, pracujące na zasadzie konwencjonalnych technologii oczyszczania w oparciu o pracę osadu czynnego. Podejście to jest najbardziej zgłębiane przez naukowców i jest obecnie najpowszechniejszym sposobem utylizacji ścieków stosowanym w praktyce. Uzyskane dotąd efekty prac nad surowymi cieczami pofermentacyjnymi nie są jednak zadowalające ze względu na próby jednoczesnego rozwiązania problemu znacznego obciążenia ścieku azotem wraz z degradacją innych zanieczyszczeń, co wiąże się z koniecznością ponoszenia znacznych, dodatkowych kosztów [Stier i Fischer 1998; Cydzik-Kwiatkowska i Zielińska 2016].

Podsumowując, wymienione wyżej metody są niewystarczająco efektywne i wciąż poszukiwane są bardziej skuteczne rozwiązania.

Innowacyjnym podejściem jest wykorzystanie mieszanych konsorcjów bakteryjno-algowych, bakteryjno-drożdżowych, a także procesy dwustopniowego oczyszczania, angażujące na poszczególnych etapach odmienne grupy drobnoustrojów [Gekon 2015; Hałat-Łaś i in. 2018; Kaszycki i in. 2021].

2.5 Biowodór

2.5.1 Fermentacja ciemna i produkcja biowodoru

Wodór uważa się za jeden z najbardziej ekologicznych nośników energii [Looney 2020; Departament Energii Stanów Zjednoczonych 2020; Chatzimarkakis i in. 2021]. W wyniku jego spalania lub wykorzystania w ogniwie paliwowym wytwarzana jest para wodna [Kadier i in. 2016]. Pozwala to znacząco ograniczyć emisję gazów cieplarnianych oraz powstawanie kwaśnych deszczy [Kozłowski 2016]. Wodór charakteryzuje się ponadto wysoką wartością opałową, która wynosi 120 MJ/kg [Dash i in. 2023]. Dla porównania, wartość opałowa benzyny wynosi 47 MJ/kg, a węgla 25 MJ/kg [Lewandowski 2007; Hosseini i in. 2015]. Oprócz ogromnego potencjału wodoru w sektorze energetycznym jako alternatywa dla paliw kopalnych, wodór obecnie znajduje również różnorodne inne zastosowania, m. in. w sektorze przemysłu agrochemikaliów, spożywczym czy metalurgicznym [Winter 2005; Kotay 2008; Megret i in. 2015; Hosseini i Wahid 2016].

W związku z powyższym infrastruktura produkcji wodoru w najbliższej perspektywie czasowej będzie się intensywnie rozwijać, czemu sprzyjają również regulacje prawne UE i USA [Komisja Europejska 2021; Departament Energii Stanów Zjednoczonych 2020].

Niestety, dostępność gospodarcza naturalnie występującego wodoru jest bardzo ograniczona, więc niezbędne jest opracowanie tanich i wydajnych metod jego wytwarzania. Wodór może być produkowany z gazu ziemnego, oleju, poprzez zgazowanie węgla bądź elektrolizę wody. Wodór wytwarzany z paliw kopalnych nie jest traktowany jako odnawialny zasób energii. Elektroliza wody, z kolei, wymaga wysokich nakładów energetycznych, a co za tym idzie ponoszenia wysokich kosztów [Suchowska-Kisielewicz i Myszograj 2011; Cao i in. 2022]. Co więcej, procesy chemiczne wiążą się z koniecznością rozdzielania powstającego paliwa od produktów ubocznych reakcji, stosowania katalizatorów, podwyższonego ciśnienia i temperatury [Levin i Chahine 2010].

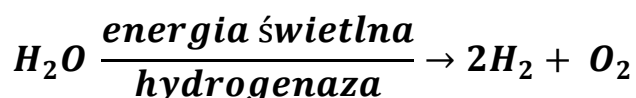
Inaczej jest w przypadku produkcji biowodoru, ponieważ procesy wydzielania tego gazu przez mikroorganizmy zachodzą zwykle w temperaturze pokojowej, w środowisku wodnym oraz pod ciśnieniem atmosferycznym [Argun i Onaran 2016]. Biologiczne metody produkcji wodoru są uważane zatem za najbardziej interesujące i obiecujące procesy [Kothari i in. 2012].

Ze względu na nowość tematyki i dynamiczny rozwój tej dziedziny, wiele jeszcze zagadnień wymaga wyjaśnienia bądź optymalizacji. Prowadzone są obecnie liczne badania naukowe nad wytwarzaniem biowodoru, dlatego, też w niniejszej pracy mechanizmy biologiczne opisano w nieco szerszym ujęciu.

Metody mikrobiologicznej produkcji biowodoru to m. in.: bezpośrednia fotoliza wody z udziałem mikroskopowych alg czy cyjanobakterii, fotobiologiczny rozkład związków organicznych z udziałem heterotroficznych purpurowych bakterii beziarkowych, procesy

bioelektrochemiczne (bioelektroliza) oraz fermentacja [Moritz 2012]. Substratem do produkcji biowodoru jest w metodach biologicznych woda bądź związki organiczne, którymi mogą być zanieczyszczenia występujące w ściekach [Das i Veziroglu 2008; Shimizu i in. 2019].

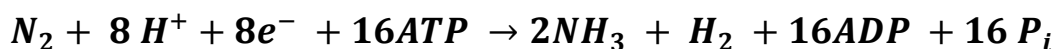
W procesie **biologicznej fotolizy wody** następuje rozbitcie jej cząsteczek i wykorzystanie powstających elektronów do redukcji jonów wodorowych. Proces prowadzony jest przy udziale energii słonecznej i zachodzi w komórkach mikroglonów z udziałem enzymu – hydrogenazy [Kamran i Fazal 2021; Witkowska i in. 2021].



Ryc. 5. Reakcja biofotolizy wody

Aktywność hydrogenazy jest hamowana w obecności tlenu, co oznacza, że proces biofotolizy jest procesem samoograniczającym się. Aby utrzymać ciągły proces produkcji biowodoru, konieczne jest zatem usuwanie powstającego tlenu, ponieważ w jego obecności wodór zostaje wykorzystany do redukcji CO₂ [Dziga 2015].

Z kolei, rozkład związków organicznych przy współudziale energii słonecznej, zwyczajowo zwany **fotof fermentacją**, przebiega w warunkach beztlenowych, w obecności światła oraz substratów organicznych. Purpurowe bakterie bezsiarkowe z rodzaju *Rhodobacter* są zdolne do metabolizowania rozmaitych związków organicznych, takich jak kwasy organiczne, cukry proste, czy składniki odżywcze zawarte w ściekach przemysłowych i rolniczych [Orsi i in. 2021]. Kluczowym enzymem biorącym udział w tym procesie jest nitrogenaza. Enzym ten to kompleks nitrogenazy oraz reduktazy nitrogenazy i jest zdolny do wiązania azotu cząsteczkowego zgodnie z równaniem reakcji:



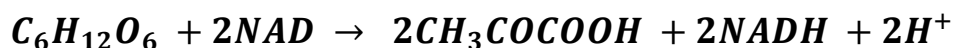
Ryc. 6. Reakcja fotof fermentacji charakterystyczna dla bakterii rodzaju *Rhodobacter*

Reakcja powyższa jest hamowana przez tlen, wysoką wartość stosunku azotu aminokwasowego do zawartości węgla w podłożu oraz obecność jonów amonowych [Adessi i De Philippis 2012].

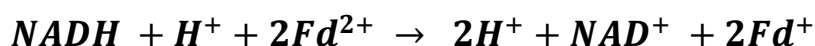
Proces **bioelektrochemicznej produkcji wodoru** jest połączeniem klasycznej elektrolizy oraz zdolności metabolicznych drobnoustrojów. Przyłożenie zewnętrznego potencjału do zacisków bioelektrolizera powoduje utlenianie związków organicznych na powierzchni anody pokrytej biofilmem bakteryjnym oraz wydzielanie wodoru cząsteczkowego z powierzchni katody (najczęściej platynowej). Proces ten związany jest z redukcją protonów i może się odbywać z wykorzystaniem zanieczyszczeń znajdujących się w ściekach [Moritz 2012].

Produkcja biowodoru na drodze **fermentacji beztlenowej**, zwanej – w odróżnieniu od fermentacji metanowej – **fermentacją ciemną** (ang. *dark fermentation*), jest wskazywana jako najbardziej skuteczna metoda jego pozyskiwania. Charakteryzuje się ona wysoką wydajnością przy jednocześnie niskich kosztach oraz możliwością wykorzystywania szerokiego spektrum substratów organicznych, również tych zawartych w odpadach i ściekach [Hu i in. 2013]. Fermentacja prowadzona jest przez wyspecjalizowane bakterie beztlenowe, a biowodór wytwarzany jest w obecności specyficznych enzymów i koenzymów w wyniku następujących reakcji przemian biochemicznych:

- (1) w procesie rozkładu kwasów organicznych przez dehydrogenazę zależną od NAD^+ z wytworzeniem zredukowanej formy dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADH)

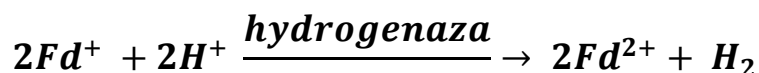


- (2) podczas utlenienia NADH



gdzie: Fd to Ferredoksyna

Na koniec, gazowy wodór powstaje podczas reakcji z udziałem enzymu hydrogenazy i z wykorzystaniem elektronów pochodzących z ferredoksyny.



Ryc. 7. Reakcje wytwarzania biowodoru w procesie tzw. fermentacji ciemnej

Na podstawie szacowania bilansu energetycznego powyższych reakcji określono, że z jednego kilograma węglowodanów można teoretycznie uzyskać około 4,41 kWh energii. Z kolei, w praktyce przemysłowej, uwzględniając możliwości technologiczne produkcji biopaliw, z takiej ilości surowca wytwarza się ok. 0,5 dm³ etanolu, 1,2 m³ gazowego wodoru, 0,36 m³ gazowego metanu lub 0,5 m³ biogazu, co pozwala otrzymać średnio około 1 kWh użytecznej energii [Rabaey i Verstraete 2005; Cao i in. 2022]. Fermentację wodorową należy więc uznać za wydajną i szczególnie opłacalną metodę pozyskiwania zielonej energii.

2.5.2 Substraty do produkcji wodoru metodą ciemnej fermentacji

Specyfika wytwarzania biowodoru metodą ciemnej fermentacji stwarza możliwość wykorzystanie różnorodnych substratów, między innymi [Kucharska K. i in. 2019; Kamran i Fazal 2021; Das i Basak 2021]:

- hydrolizatów gliceryny
- pozostałości rolnicze
- biomasa lignocelulozowa,
- ścieki przemysłowe,
- pozostałości poźniwne
- stałe odpady komunalne.



Ryc. 8. Substraty do produkcji biowodoru (odpady komunalne i przemysłowe zawierające skrobię) [Das i Basak 2021]

Ostatnio zaproponowano wykorzystanie i zagospodarowanie pozostałości po produkcji cukru – wysłodków buraczanych (wysłodków), na dużą skalę [Cieciura-Włoch i Borowski 2019; Borowski i Kucner 2019; Cieciura-Włoch i in. 2020]. Według aktualnych analiz

światowego rynku cukru, produkcja cukru spożywczego w latach 2022/23 (zarówno z trzciny cukrowej, jak i buraków cukrowych) szacowana jest na 183,2 mln ton (Mt), z czego 16,2 mln ton w UE [US Department of Agriculture Foreign Agricultural Service Sugar 2022]. Światowa produkcja buraków cukrowych wyniosła 253 mln ton (dane z 2020 r.), a Polska zajęła 6. miejsce z udziałem 5,6% [Rocznik Statystyczny RP 2022].

Wysłodki są łatwo dostępnym materiałem bogatym w węglowodany, można je pozyskać i przetwarzać niskim kosztem, a ponadto nie wymagają one szczególnej obróbki wstępnej przed fermentacją. W dotychczas opublikowanych doniesieniach hydrolizaty wysłodków buraczanych poddano ciemniej fermentacji w warunkach mezofilnych, chociaż fermentacja termofilna może być również z powodzeniem stosowana do produkcji biowodoru (dane współpracowników z Politechniki Łódzkiej, prace koordynowane przez prof. Sebastiana Borowskiego, dotychczas nieopublikowane).

2.5.3 Masa pofermentacyjna – waloryzacja i jej dalsze wykorzystanie

Produkcja biowodoru prowadzona na drodze ciemniej fermentacji, pomimo szeregu niekwestionowanych zalet, wiąże się z powstawaniem znacznej ilości masy pofermentacyjnej, której wyciek do środowiska może powodować liczne zagrożenia. Odpady te, a zwłaszcza odcieki są wysoce heterogeniczne, zawierają liczne substancje toksyczne, w tym głównie lotne kwasy organiczne (ang. *Volatile fatty acids*, VFAs), które stanowią produkt uboczny fermentacji, jak również biogeny azot i fosfor powstały w wyniku mineralizacji substratów [Turon i in. 2016].

Wysoki ładunek substancji organicznych sprawia, że pofermenty pochodzące z procesu ciemniej fermentacji mogą być wykorzystane do produkcji dodatkowej energii, wytwarzania biopaliw czy biosyntezy materiałów [Guo i in. 2010; Chatellard i in. 2017]. Istnieją liczne doniesienia naukowe skupiające się na zagadnieniu tzw. waloryzacji masy pofermentacyjnej tak, aby zwiększyć wydajność produkcji wodoru i zmaksymalizować odzysk energii [Kapdan i Kargi 2006; Sivagurunathan i in. 2017]. Na ryc. 9. przedstawiono najważniejsze metody prowadzące do dalszego wykorzystania masy pofermentacyjnej.

Podobnie jak w przypadku produkcji biogazu, przy biowodorze niezbędnym zabiegiem jest separacja faz. Często stosowanym podejściem jest częściowe odwadnianie masy pofermentacyjnej i wykorzystywanie zatężonej frakcji organicznej do procesu fermentacji metanowej z produkcją biogazu (biometanizacja). Proces fermentacji metanowej pozwala na wykorzystanie materii organicznej pozostałej po fermentacji wodorowej do produkcji biogazu. Prowadzone prace wskazują na możliwości wykorzystania tego podejścia w praktyce, jednakże jedynie w ściśle określonych przypadkach. Zmienność substratów i parametrów fizyko-chemicznych pofermentu może negatywnie wpływać na przeżywalność mikroorganizmów, a co za tym idzie na wydajność całego procesu [Kasprzycka 2011].

Frakcja pofermentu po odwodnieniu może także zostać wykorzystana jako substrat do hodowli fotosyntetyzujących mikroalg i bakterii, tlenowych i beztlenowych hodowli bakterii,

w mikrobiologicznych ogniwach paliwowych (ang. *Microbial fuel cell*, MFC) oraz w bioelektrolizie (ang. *Microbial electrolysis cell*, MEC).

Połączenie procesów ciemnej fermentacji z hodowlą mikroalg jest korzystne, ponieważ pozwala doprowadzić do pełnej waloryzacji produktów końcowych, w których wytworzona biomasa mikroglonów może zostać zawrócona do komór fermentacyjnych jako dodatkowy substrat. Mikroglony mogą być również wykorzystywane do gromadzenia węglowodanów lub biolipidów, które są naturalnie wytwarzane podczas hodowli w podłożach zawierających kwasy karboksylowe w warunkach głodzenia, m.in. podczas niedoboru azotu [Munoz i Guieysse 2006; Chen i in. 2016]. Zagrożeniem dla procesu hodowli mikroalg, ograniczającym ich proliferację i uzyskaną liczebność, jest jednakże obecność bakterii przedostających się z komór fermentacji.

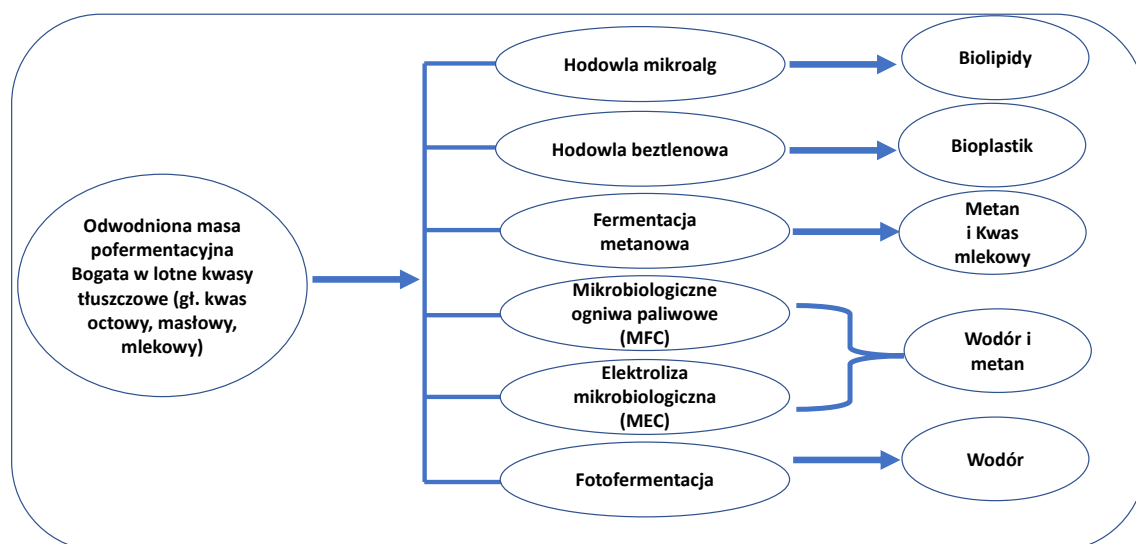
W przypadku **procesów fotobiologicznych**, kwasy organiczne pozostałe w pofermencie mogą być zmetabolizowane przez bakterie [Rai i in. 2012]. Najczęściej wykorzystywane są do tego celu bakterie purpurowe z rodzaju *Rhodobacter* sp. Maksymalna teoretyczna wydajność produkcji biowodoru w tym procesie wynosi 4 mole H₂ z każdego mola kwasu octowego [Hosseini i Wahid 2016]. Takie dwuetapowe podejście pozwala zmaksymalizować wydajność produkcji wodoru, jednakże posiada też wiele ograniczeń. Wśród nich wymienić należy inhibicję procesu w obecności związków azotu, konieczność zapewnienia optymalnych warunków rozwoju specyficznych drobnoustrojów, możliwość zakażeń szczepami niekorzystnymi oraz wysokie koszty aparatury i mediów.

Integracja ciemnej fermentacji z technologią **produkcji biopolimerów** (biotworzyw) czyni proces bardziej zrównoważonym i ekonomicznie opłacalnym. Masa pofermentacyjna stanowi obiecujący surowiec do wydajnej produkcji i akumulacji biopolimerów (takich jak polihydroksyalkaniany, PHA czy polihydroksymaślan, PHB) w bakteriach komórek w drugim etapie zintegrowanego bioprocessu. Wytwarzanie PHA przez hodowle pojedynczych szczepów z podawaniem syntetycznych substratów jako źródła węgla (np. octan, maślan, itp.) jest mało opłacalne w przypadku produkcji na dużą skalę. VFA są prostymi metabolitami bogatymi w kwasy o niewielkiej liczbie atomów węgla, co umożliwia produkcję PHA przy zaangażowaniu mniejszej liczby enzymów w porównaniu z glikolizą i β-oksydacją [Amulya i in. 2014]. Podczas wdrażania tego podejścia do praktyki przemysłowej ważne jest zwiększenie zdolności magazynowania PHA w komórkach bakteryjnych i poprawa wydajności produkcji PHA [Puyol i in. 2017].

W przypadku zastosowania mikrobiologicznych ogniw paliwowych (MFC), wytwarzanie energii elektrycznej odbywa się na skutek zdolności przekształcania energii chemicznej w elektryczną, bez udziału reakcji pośrednich. Mikroorganizmy utleniają substancje organiczne zawarte w ściekach czerpiąc elektrony, które transportowane są na drodze istniejącego obwodu zewnętrznego. Jony wodorowe powstające na anodzie przemieszczają się do katody, po czym łączą się z cząsteczkami tlenu, w wyniku czego powstaje woda [Deval i in. 2017]. Należy tu jednak podkreślić, że zarówno MEC, jak i MFC wymagają użycia drogiej specjalistycznej aparatury, co w połączeniu z wysokimi kosztami i prowadzenia procesu sprawiają, że konieczne są dalsze prace optymalizacyjne .

Proces MEC może być wykorzystywany do produkcji biowodoru, metanu, nadtlenu wodoru czy kwasu mrówkowego [Cheng i Logan 2007], a także w oczyszczaniu ścieków [Escapa i in. 2014] i bioremediacji [Haddadi i in. 2014]. Elektrochemicznie aktywne bakterie (ang. *Electrochemically active bacteria*, EAB) czyli grupa mikroorganizmów zdolnych do uwalniania elektronów z komórek i przekazywania ich na elektrodę lub też przyjmowania elektronów od donora elektronów, są zdolne do całkowitej konwersji biodegradowalnej materii organicznej do wodoru i dwutlenku węgla. Połączenie procesu ciemnej fermentacji z mikrobiologiczną elektrolizą pozwala znacząco zwiększyć wydajność produkcji biowodoru [Sleutels i in. 2013; Khongkliang i in. 2019].

Reasumując, obecnie trwają intensywne prace zmierzające do poprawy wydajności, opłacalności i stabilności wyżej opisanych procesów. Proponowane i doskonalone rozwiązania są jednak wciąż w fazie testów [Preethi i in. 2019].



Ryc. 9. Schemat przedstawiający sposoby waloryzacji masy powstałej po fermentacji ciemnej [Sivagurunathan i in. 2017]

Należy także zwrócić uwagę, że w każdym z przedstawionych procesów jednak wciąż powstają pozostałości (produkty uboczne) – toksyczne ścieki przemysłowe, które wymagają oczyszczenia.

2.5.4 Odciek po fermentacji wodorowej – charakterystyka i potrzeba oczyszczania

Podczas wykonywania czynności separacji faz z pulpy pofermentacyjnej, frakcja cieczy nadmiarowej pozostająca po odwirowaniu masy może częściowo zostać zawrócona jako woda technologiczna zasilająca komory fermentacji ciemniej. Jej użycie jednak nie może być wyższe niż ok. 20% objętości roboczej fermentora i wiąże się z ryzykiem postępującej kumulacji związków niekorzystnych i toksycznych (substancji biogennych: N, P, S, metali ciężkich), co może negatywnie wpływać na wydajność produkcji biowodoru.

Jak już wspomniano powyżej, dokładny skład odcieków pofermentacyjnych wykazuje dużą zmienność i nie zawsze jest w pełni określony. Co więcej, skład chemiczny, a zwłaszcza stosunek C:N:P ma kluczowe znaczenie dla prawidłowego przebiegu kolejnych etapów bioprocessu. Przed wykorzystaniem odcieku należy również mieć na uwadze jego potencjalną toksyczność i możliwe zanieczyszczenia mikrobiologiczne.

W polskim prawie produkty fermentacji metanowej i ciemnej są tak samo klasyfikowane, zatem podobnie jak w przypadku biogazu odpady powstałe w wyniku fermentacji ciemnej są odpadami. W związku z powyższym, wprowadzenie cieczy pofermentacyjnych do środowiska wiąże się z koniecznością przedsięwzięcia odpowiednich działań, mających na celu przede wszystkim obniżenie zawartości substancji toksycznych i zmniejszenie obciążenia związkami węgla organicznego.

Głównymi zanieczyszczeniami odcieku jest materia organiczna (wartość chemicznego zapotrzebowanie tlenu, ChZT, najczęściej w zakresie 18 000 – 47 000 mg O₂/L), składająca się głównie z kwasów organicznych (kwas mrówkowy, mlekowy, n-masłowy, i-masłowy, propionowy, octowy, a niekiedy również kwas i-walerianowy, n-walerianowy, i-kapronowy, n-kapronowy i i-heptanowy). Udowodniono, że kwasy organiczne mogą wykazywać działanie toksyczne [Cieciura-Włoch i in. 2020]. Opisana w dostępnych publikacjach zawartość substancji biogennych waha się w szerokim zakresie, w zależności od zestawu substratów poddawanych ciemnej fermentacji. Całkowita zawartość azotu amonowego wynosiła od 57,50 do 800 mg/L, podczas gdy zawartość fosforu nieorganicznego wykazywała jeszcze większą zmienność: od 15 do 1580 mg/L [Turon 2015; Cieciura-Włoch i Borowski 2019; Guo 2020; Cieciura-Włoch i in. 2020; Cieciura-Włoch i in. 2021]. Nadmiarowe ilości fosforu mogą pojawić się w ściekach z komory fermentacyjnej głównie z powodu biologicznej mineralizacji substratów organicznych, z których powstają fosforany obok azotu amonowego. Ponadto, podwyższone poziomy tego pierwiastka mogą być rezultatem sposobu wstępnego przygotowania substratu [Cieciura-Włoch i Borowski 2019], bezpośredniej suplementacji fosforanem w celu zwiększenia wydajności wytwarzania biowodoru [Cieciura-Włoch i in. 2021], czy też wykorzystania do inicjacji procesu fermentacji ciemniej *inoculum* bakteryjnego wzbogaconego w fosfor, pobranego z eutrofizowanego fermentora beztlenowego.

Opisane wysokie poziomy ChZT i fosforu przekraczają znacząco normy określone w stosownym rozporządzeniu [Rozporządzenie Ministra Gospodarki Morskiej i Żeglugi Śródlądowej 2019] i stanowią poważne zagrożenie dla środowiska. Niezbędne jest zatem

opracowanie skutecznej i taniej metody oczyszczania odcieków powstałych podczas fermentacji ciemnej odpadowych substratów, w tym zwłaszcza biomasy pochodzenia rolniczego. Jest to zadanie szczególnie istotne w kontekście wzrastającego zainteresowania biologiczną produkcją wodoru na cele energetyczne. Jakkolwiek jest to dziedzina stosunkowo nowa, jej niekwestionowany potencjał sprawia, że obecnie skupia coraz więcej uwagi naukowców biotechnologów i producentów przemysłowych.

3. Badania własne

3.1 Hipotezy i cele badawcze

Przestawiona powyżej problematyka zagrożeń środowiskowych spowodowanych wytwarzaniem cieczy powstałych po fermentacji biogazu i biowodoru wymaga opracowania efektywnych metod unieszkodliwiania tego typu odpadów.

Zagadnienia te są ważne, niemniej, bardzo wiele aspektów nie zostało jeszcze w pełni udokumentowanych stosownymi badaniami. W niniejszej pracy sformułowano następujące hipotezy, których weryfikacja w intencji autorki wydaje się mieć kluczowe znaczenie z punktu widzenia odpowiedniego zagospodarowania cieczy pofermentacyjnych przed wprowadzeniem ich do środowiska bądź do systemu oczyszczalni ścieków:

1. Wyspecjalizowane i adaptowane do niekorzystnych warunków bytowania szczepy drobnoustrojów pro- i eukariotycznych: bakterii, mikroskopowych glonów i drożdży, wyizolowane z różnorodnych, naturalnych siedlisk środowiskowych, w tym zwłaszcza z obszarów zanieczyszczonych antropogenicznie wykazują aktywności biochemiczne pozwalające je wykorzystać do skutecznego oczyszczania eutrofizowanych i uciążliwych ścieków przemysłowych powstałych w procesach fermentacji metanowej i ciemnej fermentacji wytwarzania biowodoru..
2. Staranna selekcja i odpowiedni dobór izolatów opisanych w p.1. umożliwia konstrukcję wielogatunkowych konsorcjów mikrobiologicznych, przeznaczonych do wspomagania procesów oczyszczania cieczy pofermentacyjnych oraz do likwidacji czynników toksycznych w nich zawartych.
3. Bioróżnorodne konsorcja mikrobiologiczne wykazują, w zestawieniu z monokulturami poszczególnych szczepów, największą skuteczność biodegradacji zanieczyszczeń organicznych i eliminacji substancji biogenych w cieczach pofermentacyjnych. Jest to skutkiem uzyskania efektu synergii współdziałających ze sobą drobnoustrojów, a najwyższa aktywność wykazywana jest przez mieszane konsorcja bakteryjno-drożdżowe, i bakteryjno-algowe, jak również działające sekwencyjnie układy mieszane obejmujące bakterie, drożdże oraz mikroglony izolowane ze środowiska.
4. Właściwości cieczy pofermentacyjnych, a zwłaszcza podatność na bioremediację i toksyczność, uwarunkowane składem frakcji organicznej i zawartością biogenów, różnią się zależnie od substratów użytych do prowadzonego bioprocessu; heterogeniczność tych odcieków stanowi podstawowy parametr warunkujący opracowanie optymalnych metod biologicznego oczyszczania.

Aby zweryfikować powyższe hipotezy wyznaczono następujące cele naukowe:

Głównym zamierzeniem pracy było opracowanie nowych, innowacyjnych, wariantowych technologii wstępnego oczyszczania cieczy pofermentacyjnych poprzez biokonwersję uciążliwych i potencjalnie toksycznych składników z użyciem wyspecjalizowanych konsorcjów mikrobiologicznych.

W badaniach zaplanowano i przeprowadzono szereg etapowych prac doświadczalnych, obejmujących szczegółowe analizy próbek odcieków pofermentacyjnych, pochodzących z instalacji modelowych i rzeczywistych, poddanych bioremediacji w wielu układach pracujących drobnoustrojów z grupy bakterii auto- i allochtonicznych, drożdży konwencjonalnych i niekonwencjonalnych oraz mikroskopowych glonów środowiskowych. Podczas wykonywanych eksperymentów i testów realizowano cele szczegółowe, którymi były:

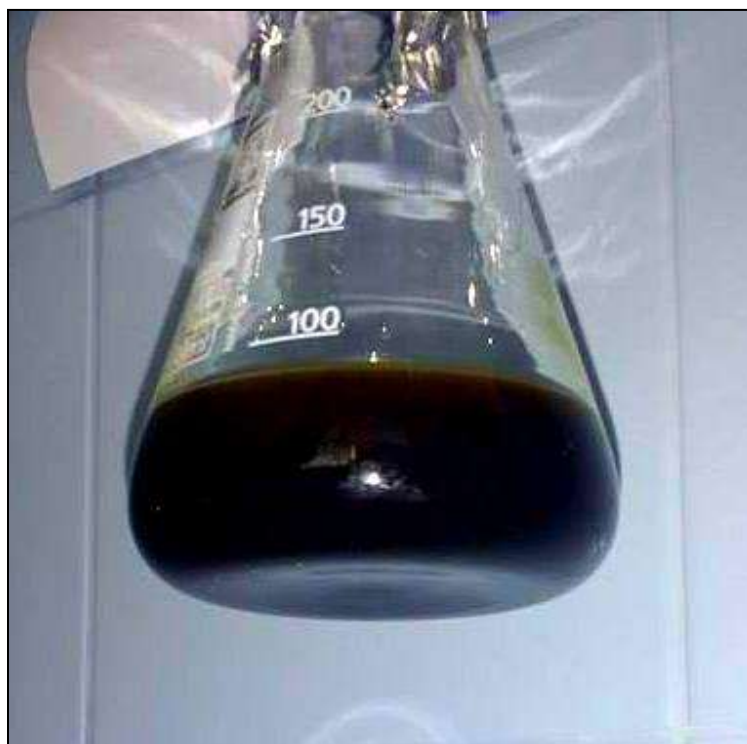
1. Ustalenie zmienności czasowej i miejscowo - specyficznej składu oraz obciążenia cieczy pofermentacyjnych, otrzymanych w warunkach użycia różnych substratów do biometanizacji.
2. Stwierdzenie występowania w odciekach pofermentacyjnych drobnoustrojów autochtonicznych z określeniem ich przydatności biotechnologicznej.
3. Testowanie toksyczności odcieków względem wybranych drobnoustrojów allochtonicznych, pochodzących z różnych siedlisk środowiskowych, w tym specjalistycznych bakterii i drożdży, jak również względem osadów czynnych pochodzących z biologicznych oczyszczalni ścieków.
4. Prace nad selekcją i adaptacją, a następnie badania monokultur bakterii allochtonicznych, pozyskanych z gleby i wód zanieczyszczonych antropogenicznie pod kątem ich zdolności do usuwania zanieczyszczeń w cieczach pofermentacyjnych.
5. Dobór bioróżnorodnych konsorcjów bakteryjnych, drożdżowych, bakteryjno-drożdżowych oraz bakteryjno-drożdżowych z komponentą mikroskopowych glonów, zdolnych do usuwania biogenów i efektywnej bioremediacji związków potencjalnie toksycznych w cieczach pofermentacyjnych.
6. Konstrukcja wyspecjalizowanych konsorcjów drobnoustrojów pro- i eukariotycznych, przewidzianych do oczyszczania odcieków pofermentacyjnych charakteryzujących się specyficznym składem. Ukierunkowane konsorcja mają w zamierzeniu posłużyć jako szczepionki mikrobiologiczne do komór napowietrzania, z perspektywą wytworzenia osadów czynnych lub złożeń biologicznych w instalacjach biologicznego oczyszczalnia ścieków.

3.2 Materiały i metody

3.2.1 Materiał badawczy: ciecze pofermentacyjne

3.2.1.1 Odcieki po produkcji biogazu w warunkach laboratoryjnych

Produkcja biogazu w laboratoryjnej instalacji modelowej prowadzona była w skali ułamkowo-technicznej na Politechnice Łódzkiej przez grupę kierowaną przez prof. Sebastiana Borowskiego. Komory biofermentorów zasilane były różnymi wariantami substratów: osadami ściekowymi (odciek oznaczony A), odpadami poubojowymi (B), wysłódkami buraczanymi (C+D), a także pomiotem kurzym (E). Każdy bioreaktor miał objętość roboczą 3 dm³ i był sprzężony z 4 dm³ zbiornikiem na gaz umożliwiającym zachowanie warunków beztlenowych i kontrolę dobowej produkcji biogazu. Reaktory działały w warunkach fermentacji mezofilnej: temperaturze roboczej $35 \pm 1^\circ\text{C}$ z mieszaniem za pomocą mieszadła mechanicznego (cykle pracy 80 obr./min przez 15 minut co godzinę). Substrat surowy wprowadzano do reaktora raz na dobę przy użyciu pompy perystaltycznej. Przed każdą suplementacją, z komory fermentacyjnej odprowadzano objętość cieczy równą nowo podawanej w celu utrzymania stałej objętości roboczej. Pobrane próbki cieczy, po oddzieleniu osadu, stanowiły materiał badawczy w prowadzonych analizach [Borowski i in. 2015].



Ryc. 10. Przykład badanych odcieków – kolba z cieczą powstałą w wyniku fermentacji pomiotu kurzego (odciek E)

3.2.1.2 Ciecze pofermentacyjne po przemysłowej fermentacji metanowej

Ciecze pofermentacyjne rzeczywiste pozyskano z reprezentatywnych, średniej wielkości instalacji do fermentacji metanowej zlokalizowanych w Polsce w Bielsko Białej (odciek pochodzący z tej oczyszczalni w dalszej części pracy opisywany jest jako odciek BB) oraz w Krzeszowicach (odciek pochodzący z tej oczyszczalni w dalszej części pracy opisywany jest jako odciek KK) i na Słowacji w miejscowości Bošany (odciek w dalszej części pracy jest opisywany jako odciek BSZ). Instalacje te charakteryzowały się wykorzystywaniem jednorodnego substratu organicznego oraz stabilnością warunków prowadzonej fermentacji metanowej. Odcieki BB i KK powstawały w wyniku fermentacji osadów z oczyszczalni miejskiej, natomiast odciek BSZ w wyniku zgazowania gnojowicy świńskiej.

3.2.1.3 Odcieki pofermentacyjne po fermentacji ciemnej (wodorowej)

Ciecze pofermentacyjne powstające podczas produkcji biowodoru zostały pozyskane z modelowego układu fermentorów pracujących w skali laboratoryjnej z Politechniki Łódzkiej w ramach współpracy z prof. Sebastianem Borowskim. Proces ciemnej fermentacji prowadzono w fermentorach o pojemności roboczej 1 dm³ w trybie półciągłym z dokarmianiem pracującej biocenozy bakteryjnej i odprowadzaniem nadmiarowej cieczy raz na dobę. Fermentacja przebiegała w warunkach mezofilnych (temp. 35 ± 1°C) lub termofilnych (55 ± 1°C). Zaszczepem bakteryjnym niezbędnym do uruchomienia procesu fermentacji były mikrobiologiczne konsorcja beztlenowe pobrane z mezofilowych beztlenowych komór fermentacyjnych produkcji biogazu Miejskiej Oczyszczalni Ścieków w Łodzi. Wyjściowe biocenozy składały się zarówno z bakterii wytwarzających wodór, jak i niekorzystnych archeonów metanogennych. W celu inaktywacji niepożądanych składników, konsorcja po pobraniu poddano przed zaszczepieniem do bioreaktorów fermentacji ciemnej wstępnej obróbce termicznej w temperaturze 80°C przez 1,5 godziny.

Świeże wysłodki buraczane przeznaczone do ciemnej fermentacji otrzymano od producenta cukru w Dobrzelinie (Krajowy Zespół Przemysłu Spożywczego, Oddział Cukrowni Dobrzelin, Polska). Ze względu na sezonowość produkcji cukru, świeże wysłodki zbierano w okresie produkcji i przechowywano w temperaturze -18°C. Przed użyciem wysłodki poddawano wstępnej obróbce scukrzającej preparatami enzymów hydrolitycznych, jak opisano w pracy zespołu prof. Borowskiego [Cieciura-Włoch i in. 2020].

Do badań przekazano cztery odcieki pofermentacyjne. Pogrupowano je w pary: jedna para pochodziła z procesów mezofilnych (M), a druga z procesów termofilnych (T). Próbkami analizowanych ścieków były płynne supernatanty (ciecze nadosadowe) otrzymane po dekantacji zebranych mas pofermentacyjnych i przekierowaniu bogatych w substancje organiczne osadów do etapu biometanizacji (ryc. 9). Każda para supernatantów różniła się zasadniczo pod względem zawartości fosforu nieorganicznego i z tego powodu próbki oznaczono jako „P+” i „P-”, aby określić, odpowiednio, wysoki i niski poziom tego

biogennego pierwiastka. Ostatecznie, badanym próbkom ścieków pofermentacyjnych nadano oznaczenia: MP+, MP-, TP+ i TP- (szczegółowa charakterystyka znajduje się w rozdziale wyniki).

3.2.2 Materiał mikrobiologiczny – bakterie środowiskowe, konsorcja drobnoustrojów i osad czynny

W testach toksyczności oraz badaniach bioremediacji z wykorzystaniem drobnoustrojów allochtonicznych, próbki cieczy pofermentacyjnych zaszczipiano wybranymi monokulturami bakteryjnymi lub konsorcjami drobnoustrojów pro- i eukariotycznych, scharakteryzowanymi poniżej.

Standardowo, drobnoustroje hodowano w optymalnych warunkach aż do uzyskania gęstej zawiesiny o liczebności rzędu 10^8 – 10^9 jtk/mL. Następnie hodowle wirowano przy 7000 obr./min (bakterie) lub 3500 obr./min (drożdże) przez 10 min, a otrzymane osady biomasy zawieszano w badanych odciekach. Podczas inkubacji analizowano zmiany liczebności drobnoustrojów.

W pracach badawczych obejmujących obserwacje monokultur drobnoustrojów w środowisku odcieków pofermentacyjnych wykorzystano opisane poniżej hodowle wybranych, czystych mikrobiologicznie szczepów bakterii i drożdży.

3.2.2.1 Bakterie

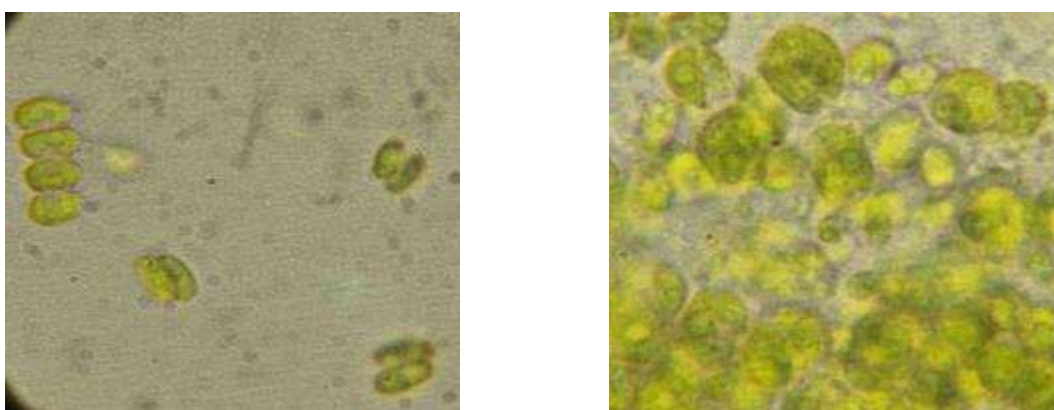
- *Pseudomonas* sp. 18 – jest to Gram-ujemna pałeczka, wyizolowana w pracach wcześniejszych ze środowisk zanieczyszczonych produktami ropopochodnymi. Wykazano, że szczep ten jest zdolny do biodegradacji węglowodorów alifatycznych i aromatycznych, a także wielu innych ksenobiotyków (dane niepublikowane).
- Szczep *Zoogloea ramigera* promujący tworzenie się kłaczków w osadach czynnych (obecnie przeklasyfikowany jako *Shinella zoogloeoides*) – jest Gram-ujemną bakterią z rodziny *Rhizobiaceae*, zdolną do wytwarzania pozakomórkowej macierzy śluzowej, która umożliwia flokulację osadu czynnego, a tym samym odgrywa kluczową rolę w ogólnej skuteczności oczyszczania ścieków. Modelowy szczep *Shinella zoogloeoides* DSM 287 otrzymano z Instytutu Leibniza DSMZ – Niemieckiej Kolekcji Mikroorganizmów i Kultur Komórkowych.

3.2.2.2 Drożdże

Ze względu na zdolność wielu gatunków drożdży do przyswajania amonowej formy azotu i przekształcania go w glutaminian [Walker 1998], w doświadczeniach zastosowano wybrane szczepy drożdży konwencjonalnych i niekonwencjonalnych. Testowano następujące gatunki szczepy: *Saccharomyces cerevisiae* s288-C (Kolekcja Instytutu Biologii Komórki, Ukraińska Akademia Nauk, Lwów), *Hansenula polymorpha* NCYC 2309 (*Pichia angusta*, obecnie: *Ogataea polymorpha*) (*National Collection of Yeast Cultures*, Wielka Brytania), *Trichosporon* sp. CBM-84 (Kolekcja Drobnoustrojów Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek, Kraków), oraz *Candida* sp. D11 i *Yarrowia lipolytica*, pochodzące z kolekcji Zespołu Badawczego Biochemii KBRiB UR.

3.2.2.3 Szczep mikroskopowych glonów i konsorcjum algowo-bakteryjne

Do biologicznego oczyszczania odcieku BB wykorzystano mikroglony *Chlorella sorokiniana* szczep SAG 211-8k (Sammlung von Algenkulturen, Göttingen, Niemcy) oraz wyizolowane ze środowiska konsorcjum ZTT-3, stanowiące mieszaną biocenozę glonowo-bakteryjną z przewagą jednokomórkowych zielonych glonów należących do gromady zielenic (*Chlorophyta*). Konsorcjum ZTT-3 zostało przez grupę współpracujących badaczy z WBBiB, UJ, pod kierunkiem prof. Przemysława Malca, wyizolowane i wyselekcjonowane z eutroficznego zbiornika wodnego o wysokim stopniu zanieczyszczenia związkami azotowymi.



Ryc. 11. Obrazy mikroskopowe konsorcjum ZTT-3 (po lewej) oraz szczepu *Chlorella sorokiniana* SAG 211-8k [Fot. własna]

3.2.2.4 Biopreparat ZB-01

Źródłem bakterii, które przeznaczono do traktowania odcieku BB była biocenoza ZB-01, stanowiąca wielogatunkowy biopreparat składający się z tlenowych bakterii środowiskowych, wytworzony w oparciu o wcześniej wyizolowane i selekcionowane szczepy autochtoniczne, zasiedlające obszary zanieczyszczone antropogenicznie. Konsorcjum ZB-01 hodowane jest w sposób ciągły (ryc. 12) i poddawane presji selekcyjnej poprzez suplementację mieszaniną substancji ropopochodnych w celu utrzymania zestawu szczepów zdolnych do aktywnego rozkładu zanieczyszczeń węglowodorowych.

Biopreparat ZB-01 został opracowany w laboratoriach Zespołu Badawczego Biochemii KBRiB UR w Krakowie. Jest to tlenowa, bioróżnorodna i biologicznie zrównoważona społeczność bakterii, składająca się z wielu naturalnie występujących szczepów środowiskowych, zdolnych do biodegradacji różnych trudno rozkładalnych związków. Poszczególne składniki bakteryjne zostały wyselekcjonowane i wyizolowane przez lata z miejsc silnie zanieczyszczonych związkami organicznymi. Do najbardziej znanych szczepów należą pałeczki Gram-ujemne, pałeczki Gram-dodatnie i ziarniaki następujących rodzajów: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Ochrobactrum*, *Chromobacterium*, *Citrobacter*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Serratia* i *Alcaligenes*. Konsorcjum ZB-01, po uzyskaniu stosownego certyfikatu higienicznego dopuszczającego zastosowania w praktyce środowiskowej, było dotąd szeroko wykorzystywane w projektach bioremediacji do inicjowania i/lub stymulowania biodegradacji węglowodorów ropopochodnych w zanieczyszczonych wodach i glebach [Kaszycki i in. 2001; Augustynowicz i in. 2013; Supel i in. 2013].



Ryc. 12. Bioreaktory z hodowlą biopreparatu ZB-01, Zespół Biochemii, KBRiB, UR

3.2.2.5 Konsorcjum BLL

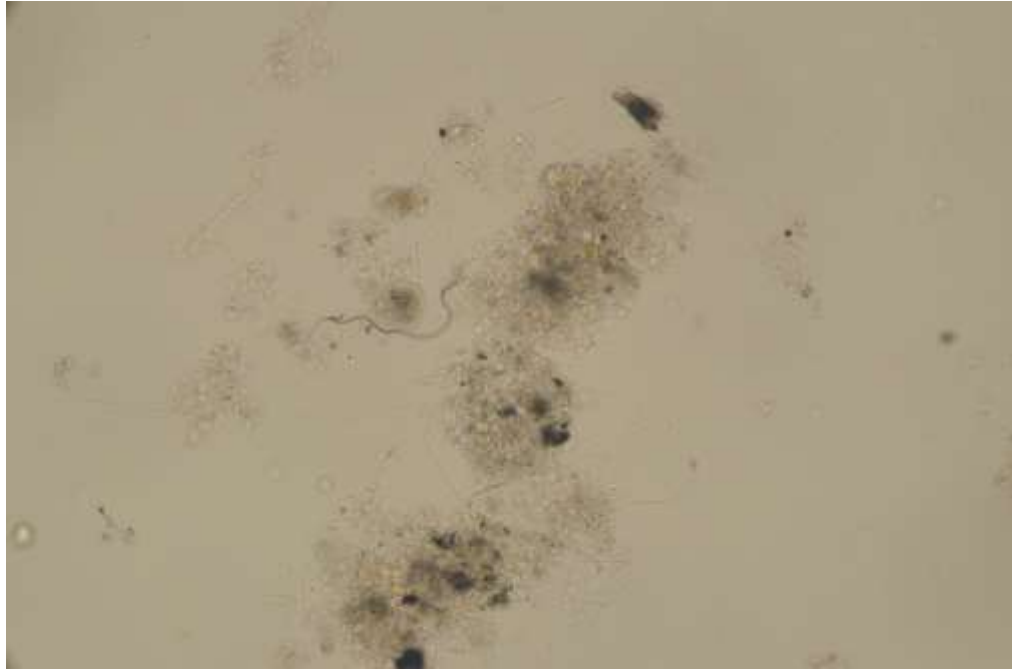
W przypadku odcieku BSZ zastosowano konsorcjum BLL, będące bioróżnorodną wspólnotą autochtonicznych drobnoustrojów amoniofilnych, wyodrębnionych przez grupę kierowaną przez prof. Przemysława Malca z mułu pochodzącego z silnie zeutrofizowanego i zanieczyszczonego ściekami bytowo-gospodarczymi obszaru naturalnie słonych jezior (wschodnia Bułgaria). W celu wyhodowania aktywnego i biologicznie stabilnego konsorcjum BLL, materiał z pozyskanych próbek biologicznych był wysiewany na płynne i stałe podłoża zawierające, jako jedyne źródło substancji pokarmowych, odcieki pofermentacyjne o różnym stopniu rozcieńczenia. Obserwowano zdolność do aerobowego wzrostu mikroorganizmów w różnych warunkach temperatury i oświetlenia, a następnie izolowano pojedyncze kolonie, które namnażano w warunkach wzrastającego stężenia odcieków pofermentacyjnych celem adaptacji do zakładanych warunków docelowych prowadzonych testów.

3.2.2.6 Konsorcjum SB

W ramach badań toksyczności cieczy pofermentacyjnych wobec różnych grup drobnoustrojów, utworzono konsorcjum bakterii glebowych oznaczone jako SB. Składa się ono z trzech szczepów: *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* (obecnie *Priestia megaterium*) i *Rhizobium radiobacter*. Bakterie te zostały wyizolowane przez nasz zespół badawczy z próbek gleby rolnej, a następnie zidentyfikowane za pomocą molekularnego systemu identyfikacji proteomicznej, jak opisano poniżej. Konsorcjum SB zostało utworzone przez zmieszanie równych objętości monokultur bakteryjnych wyhodowanych wstępnie na podłożu SNB oraz dalszą wspólną hodowlę prowadzoną w temperaturze pokojowej przez co najmniej dwa dni. Wszystkie bakterie wchodzące w skład SB należą do grupy PGPB (bakterii sprzyjających wzrostowi roślin, ang. *Plant Growth-Promoting Bacteria*), znanych z poprawiania właściwości gleby i pozytywnego wpływu na rozwój roślin.

3.2.2.7 Osad czynny

Osad czynny pochodził z komory napowietrzania Centralnej Oczyszczalni Ścieków Przedsiębiorstwa Wodociągowego w Krzeszowicach. Próbkę pobierano w okresie wiosenno-letnim oraz w dniu rozpoczęcia poszczególnych eksperymentów tak, aby kondycja drobnoustrojów była jak najlepsza (ryc.13).



Ryc. 13. Osad czynny bezpośrednio po pobraniu z komory napowietrzania oczyszczalni ścieków [Fot. własna]

O dobrej kondycji osadu świadczy brak zauważalnych wolnopływających bakterii, zwarta struktura kłaczków i obecność orzęsków (organizmy wskaźnikowe) [Kocwa-Haluch R. i Woźniakiewicz 2011]

3.2.3 Podłoża mikrobiologiczne i odczynniki chemiczne

Hodowle bakterii i drożdży prowadzono w podłożach płynnych w kolbach mikrobiologicznych oraz na podłożach zestalonych agarem na szalkach Petri'ego. Użyto następujących standaryzowanych podłoży:

1. Płynne podłoże wzrostowe SNB (ang. *Standard Nutrient Broth*) – optymalne do wzrostu biomasy bakteryjnej (tab. 2).

Tabela 2. Skład płynnego podłoża wzrostowego SNB, optymalnego dla bakterii

Nazwa podłoża	Składnik	Zawartość
Płynne podłoże wzrostowe (SNB)	Pepton kazeinowy	15,0 g/L
	Ekstrakt drożdżowy	3,0 g/L
	NaCl	6,0 g/L

2. Podłoże minimalne Bushnell–Haas (BH; Fluka Analytical; roztwór 3,27 g/L) - minimalna bakteryjna pożywka hodowlana stosowana w ocenie toksyczności i badaniach oczyszczania ścieków (tab. 3).

Tabela 3. Skład podłoża minimalnego Bushnell-Haas (BH)

Nazwa podłoża	Składnik	Zawartość
Podłoże minimalne Bushnell–Haas (BH)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,2 g/L
	CaCl_2	0,02 g/L
	K_2HPO_4	1,0 g/L
	KH_2PO_4	1,0 g/L
	NH_4NO_3	1,0 g/L
	FeCl_3	0,05 g/L
	NaCl	2,0 g/L

3. Agar wzbogacony (AW, Biomaxima, Polska) – optymalne podłoże przygotowywane było jako 2,5% zawiesina agaru wzbogaconego w wodzie destylowanej. Odważano 7,5g suchego podłoża i zawieszano w 300 mL wody destylowanej. Na płytce Petri’ego rozlewano na gorąco, bezpośrednio po sterylizacji w autoklawie. Było to podłoże stałe, przeznaczone do hodowli bakterii na szalkach Petriego, odpowiednie do analizy liczebności drobnoustrojów metodą posiewów płytkowych oraz do izolacji czystych mikrobiologicznie szczepów (tab. 4).

Tabela 4. Skład podłoża agar wzbogacony (AW)

Nazwa podłoża	Składnik	Zawartość
Agar wzbogacony (AW)	Ekstrakt mięsny	0,4 g/L
	Pepton	4,0 g/L
	Ekstrakt drożdżowy	1,7 g/L
	Enzymatyczny hydrolizat kazeiny	5,4 g/L
	Agar bakteriologiczny	14,0 g/L
	NaCl	3,5 g/L

4. Agar Sabouraud z chloramfenikolem Lab-Agar (SAB, Biomaxima, Polska; roztwór 65 g/L z dodatkiem 15 g/L agaru bakteriologicznego) – zestalone agarem podłoże specyficzne dla drożdży i pozostałych grzybów mikroskopowych, stosowane jako selektywne podłoże do izolacji i oczyszczania szczepów drożdży (tab. 5).

Tabela 5. Skład podłoża Agar Sabouraud z chloramfenikolem (SAB)

Nazwa podłoża	Składnik	Zawartość
Agar Sabouraud z chloramfenikolem (SAB)	Pepton kazeinowy	5,0 g/L
	Pepton mięsny	5,0 g/L
	D (+) glukoza	40,0 g/L
	Chloramfenikol	0,5 g/L
	Agar bakteriologiczny	15,0 g/L

5. Podłoże YPD (ang. *Yeast Extract Peptone Dextrose*) – podłoże stałe, odpowiednie do analiz liczebności drożdży) (tab. 6).

Tabela 6. Skład podłoża YPD

Nazwa podłoża	Składnik	Zawartość
Podłoże YPD	Pepton kazeinowy	20,0 g/L
	Ekstrakt drożdżowy	10,0 g/L
	Glukoza	20,0 g/L
	Agar bakteriologiczny	20 g/L

6. Płynne podłoże YCU (ang. *Yeast Common Use*) – optymalne do hodowli biomasy drożdży w zawiesinie

Tabela 7. Skład podłoża płynnego YCU

Nazwa podłoża	Składnik	Zawartość
Płynne podłoże YCU	Pepton kazeinowy	2,0 g/L
	Ekstrakt drożdżowy	20,0 g/L
	Glukoza	10,0 g/L
	Mieszanina soli mineralnych	(NH ₄) ₂ SO ₄ (3,0 g/L), CaCl ₂ · 6 H ₂ O (0,2 g/L), KH ₂ PO ₄ (0,5 g/L), MgSO ₄ · 7 H ₂ O (0,3 g/L)

Specjalistyczne podłoże stosowane do hodowli konsorcjum mikrobiologicznego: biopreparatu ZB-01, składającego się z bakterii środowiskowych degradujących węglowodory ropopochodne. Było ono użyte do oceny toksyczności ścieków DF, (tab.8).

Tabela 8. Skład podłoża płynnego do hodowli biopreparatu ZB-01

Nazwa podłoża	Składnik	Zawartość
Podłoże do hodowli biopreparatu ZB-01	Pepton kazeinowy	0,25 g/L
	Ekstrakt drożdżowy	0,25 g/L
	CH ₃ COONa	5,0 g/L
	Mieszanina soli mineralnych	(NH ₄) ₂ SO ₄ (3,0 g/L), CaCl ₂ · 6 H ₂ O (0,2 g/L), KH ₂ PO ₄ (0,5 g/L); MgSO ₄ · 7 H ₂ O (0,3 g/L)

Podłoża były przygotowywane jako suche naważki poszczególnych składników, a następnie zawieszane w określonej objętości. Po dokładnym rozpuszczeniu, podłoża sterylizowano w autoklawie parowym pod ciśnieniem 1 atmosfery, w temperaturze 121°C, przez 15-30 min (w zależności od zaleceń producentów).

Pepton kazeinowy (pankreatynowy hydrolizat kazeiny) i ekstrakt drożdżowy otrzymano z firmy Biocorp, Polska. Sole mineralne pochodziły z Lach-Ner, Czechy lub POCH, Polska. Wszystkie inne odczynniki chemiczne posiadały stopień czystości analitycznej.

Zastosowane dodatkowe źródła węgla. W prowadzonych pracach badawczych, jako źródła węgla do suplementacji odcieku KK (niska zawartość frakcji organicznej) posłużyły (podane w stężeniach 10,0 g/L): octan sodu, metanol, mannitol, sorbitol, glukoza i sacharoza (wszystkie produkcji POCh, Gliwice).

3.2.4 Metody badawcze i analityczne

3.2.4.1 Monitoring mikrobiologiczny – analizy różnorodności mikroorganizmów, ich liczebności i dynamiki zmian populacji

Gęstość populacji drobnoustrojów w zawiesinach hodowlanych oceniano przez określenie liczebności komórek zmodyfikowaną metodą seryjnych rozcieńczeń wg Kocha [Kaszycki i in. 2014].

Do zestawu jałowych probówek odmierzano po 4,5 lub 5mL jałowej soli fizjologicznej. Następnie w celu uzyskania 10-krotnego rozcieńczenia odmierzano 0,5mL hodowli drobnoustrojów, natomiast w celu uzyskania 100-krotnego rozcieńczenia, 50 μ L zawiesiny komórek. Tak przygotowane rozcieńczenia wyjściowych hodowli wysiewano na szalki Petri`ego zawierające wzrostowe podłoża agaryzowane (2,5 % agar wzbogacony) w przypadku bakterii lub agar Sabourauda (SAB) w przypadku drożdży, a następnie równomiernie rozprowadzano po powierzchni podłoża.

Płytki inkubowano przez 3 dni w temperaturze 25°C. Następnie dokonywano odczytu płytek: liczono rozwinięte kolonie (jtk – jednostka tworząca kolonie) i wynik przeliczano w taki sposób, aby wyrazić częstość występowania komórek na 1 mL próbek wyjściowych, czyli liczbę jtk/mL. Posiewy wykonywano w dwóch niezależnych powtórzeniach rozcieńczeń, a wynik końcowy podawano jako średnią uzyskanych analiz otrzymaną po uwzględnieniu kolejnych rozcieńczeń.

Podobnie, jak przy określaniu gęstości drobnoustrojów w zawiesinach hodowlanych, wykonywano analogiczne analizy w trakcie obserwacji dynamiki zmian populacji podczas inkubacji poszczególnych drobnoustrojów z odciekami, a także w testach toksyczności.

Różnorodność drobnoustrojów określano na podstawie identyfikacji odrębnych morfotypów kolonii rozwijanych na płytkach oraz obserwacji mikroskopowych komórek

drobnoustrojów w preparatach utrwalonych i wybarwionych metodą Grama (patrz pkt. 3.2.4.3 i 3.2.4.4).

3.2.4.2 Turbidymetryczna metoda oznaczania gęstości biomasy drobnoustrojów

W przypadkach braku zanieczyszczeń zawiesiną cząstek stałych, oznaczenia gęstości biomasy w hodowlach płynnych i podczas inkubacji w odciekach prowadzono również metodą pomiaru gęstości optycznej (OD, ang. *Optical Density*), wykonywanych z wykorzystaniem spektrofotometru DR 5000 UV-VIS, HACH. Pomiary wykonywano przy długości fali $\lambda=600$ nm dla bakterii oraz 540 nm dla drożdży. Próbkę pobraną z fazy rozpoczynającej się hodowli mierzono bez rozcieńczeń. Natomiast dla hodowli w fazie intensywnego wzrostu wykonywano 3- i 6-krotne rozcieńczenia solą fizjologiczną, tak aby otrzymać wartość OD wynoszącą około 1,0. Gęstość optyczną mierzono każdorazowo przy zakładaniu doświadczeń toksyczności bądź oczyszczania cieczy pofermentacyjnych.

3.2.4.3 Barwienie preparatów metodą Grama

Monokultury bakteryjne przesiewano na podłoże wzrostowe dla bakterii na 48h przed przeprowadzeniem wstępnego oznaczenia identyfikacyjnego. Barwienie preparatów metodą Grama prowadzono według procedury standardowej [Prescott i in. 2002]. W celu wykonania barwienia przygotowano zestaw odtłuszczonych szkiełek podstawowych. Następnie na tak przygotowane szkiełka podstawowe nakładano jałową eżą bakteriologiczną niewielką ilość czystej hodowli bakteryjnej pobranej bezpośrednio z szalki Petrie'go. Na preparat nakrapiano kroplę jałowej wody destylowanej i wykonywano rozmaz, po czym preparat pozostawiano do wyschnięcia. Kolejnym krokiem było utrwalenie preparatu poprzez jego trzykrotne ogrzanie nad płomieniem palnika gazowego. Na utrwalony preparat nakładano kolejno roztwór fioletu krystalicznego (60s), po czym zmywano jego nadmiar solą fizjologiczną i nawastwiano płyn Lugola. Po upływie 60s całość płukano delikatnie w alkoholu etylowym (10 – 20s). Ostatnim etapem było dobarwienie preparatu roztworem safraniny. Po 30s, w celu zmycia nadmiaru barwnika, preparat przepłukiwano wodą destylowaną i prowadzono obserwacje mikroskopowe.

3.2.4.4 Analizy mikroskopowe preparatów mikrobiologicznych

Obserwacje mikroskopowe prowadzono w mikroskopie świetlnym model Eclipse E200 z obiektywami CFI E Plan Achromat, Nikon, Japonia) w połączeniu z kamerą (model D5100, Nikon, Japonia). Bakterie obserwowano pod łącznym powiększeniem 1000x z wykorzystaniem olejku immersyjnego.

3.2.4.5 Badania toksyczności ścieków pofermentacyjnych

Allochtoniczne monokultury bakteryjne i konsorcja drobnoustrojów przetestowano pod kątem ich tolerancji na ciecze pofermentacyjne, monitorując przeżywalność komórek po inkubacji wstępnie wyhodowanej biomasy z każdym z odcieków. Bakterie (*Pseudomonas* sp. 18, *Shinella zoogloeoides* DSM 287), drożdże (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* sp. D11, *Hansenula polymorpha*, *Trichosporon* sp., *Yarrowia lipolytica*) oraz konsorcja SB i ZB-01, wstępnie hodowano w optymalnych warunkach (podłoże SNB w przypadku bakterii lub YCU dla drożdży), w temperaturze pokojowej, zapewniając wytrząsanie obrotowe przy 130 obr./min przez co najmniej 72 h, a następnie wirowano biomasę przy 7000 obr./min (bakterie) lub 3500 obr./min (drożdże) przez 10 min. Otrzymane osady biomasy ponownie zawieszano w podłożu minimalnym Bushnell-Haas w objętości takiej, aby OD po 10-krotnym rozcieńczeniu wyniosło 1,0, co odpowiadało liczebności w zakresie od 10^9 do 10^{10} jtk/mL. Następnie, każdą hodowlą zaszczerpiono odciek w stosunku objętościowym 1:9 i inkubowano przez 7 dni stosując wytrząsanie obrotowe (130 obr./min) w temperaturze 25°C w sterylnych kolbach mikrobiologicznych o pojemności 100 mL przy końcowej objętości próbki 20 mL. Przed inokulacją poszczególnymi hodowlami ścieki poddawano wirowaniu (7000 obr./min przez 10 min) w celu usunięcia wszelkich szczepów rodzimych. Podczas prowadzenia testów toksyczności określano gęstość populacji komórek na początku eksperymentu, a następnie po 1, 3 i 7 dniach traktowania. W wariacie kontrolnym biomasa poszczególnych drobnoustrojów wprowadzana była w stosunku objętościowym 1:9 do minimalnego podłoża płynnego BH i inkubowana jak wariant z odciekiem.

W niezależnym cyklu doświadczeń zbadano również wpływ odcieków na wybrane parametry osadu czynnego pobranego z komory napowietrzania oczyszczalni ścieków. Próbki osadu czynnego traktowano ściekiem w stosunku objętościowym 1:4 przez 7 dni stosując napowietrzanie poprzez wytrząsanie obrotowe przy 130 obr./min, w temperaturze 25°C w kolbach o pojemności 250 mL (objętość próbki 100 mL). Odpowiednie próbki kontrolne otrzymano przez zmieszanie osadu czynnego ze sterylną wodą (1:4 v/v) i inkubację w identycznych warunkach. Zdolność osadu czynnego do sedymentacji oceniono na podstawie obliczenia wskaźnika objętości osadu Mohlmana (SVI) według procedury zgodnej z literaturą [Gajkowska-Stefańska i in. 2007]. Wolno żyjące bakterie oznaczano w cieczach nadosadowych zebranych po sedymentacji osadu, metodą seryjnych rozcieńczeń według Kocha, jak opisano powyżej. Ponadto, analizowano morfologię kłaczek, którą udokumentowano za pomocą mikroskopii optycznej przy powiększeniu 400x lub 1000x.



Ryc. 14. Lej Imhoffa z osadem czynnym w trakcie analiz zdolności sedymentacyjnych

3.2.4.6 Izolacja oraz identyfikacja autochtonicznych szczepów występujących w cieczech pofermentacyjnych

Drobnoustroje występujące w odciekach po fermentacji wodorowej, ze względu na ich potencjalną przydatność w bioremediacji odcieków, zdecydowano się wyizolować i oczyścić do czystości mikrobiologicznej z przeznaczeniem do dalszych prac. Izolację prowadzono techniką posiewu redukcyjnego na płytki mikrobiologiczne zawierające agar wzbogacony w przypadku bakterii i podłoże SAB w przypadku drożdży. Odpowiednie objętości (25 – 100 μ l) nierozcieńczonych surowych odcieków wysiano bezpośrednio na płytki z odpowiednim podłożem i inkubowano w temperaturze pokojowej. Po 24 – 48 h inkubacji, płytki mikrobiologiczne zostały dokładnie zbadane, po czym wybrano dobrze rozwinięte kolonie drobnoustrojów, które przeniesiono za pomocą ezy bakteriologicznej na podłoże stałe (AW dla bakterii i SAB dla drożdży) i kontynuowano ich hodowlę poprzez ponowne posiewanie metodą redukcyjną, w celu dalszego oczyszczenia izolowanego szczepu. Dla każdego typu kolonii rejestrowano morfologię, wielkość, kształt i wzorzec wzrostu. Następnie wybrano przedstawicieli charakterystycznych kolonii, przeniesiono do podłoża płynnego (odpowiednio

SNB dla bakterii i YCU drożdży) i kontynuowano hodowlę w celu otrzymania materiału do wstępnej identyfikacji metodą barwienia Grama, do poddania analizie identyfikacyjnej za pomocą diagnostyki molekularnej, a także do przechowywania w kolekcji mikroorganizmów. Wszystkie zidentyfikowane autochtoniczne izolaty bakteryjne oraz jeden izolat drożdżowy wykorzystano do opracowania ukierunkowanego konsorcjum mikrobiologicznego, mającego na celu biologiczne oczyszczanie toksycznych odcieków pofermentacyjnych produkcji biowodoru.

3.2.4.7 Wstępne oczyszczanie odcieków pofermentacyjnych przy użyciu konsorcjum mikroalg i bakterii

W odcieku BB, który charakteryzował się wysokim poziomem azotu amonowego, wyjątkowo niekorzystnym stosunkiem C:N i wysoką toksycznością względem bakterii i drożdży allochtonicznych, podjęto próbę wstępnego oczyszczenia przy użyciu konsorcjum bakteryjno-algowego.

W tym celu do 120 mL odcieku pofermentacyjnego dodawano 40 mL wody destylowanej (kontrola) lub 40 mL zawiesiny konsorcjum mikroskopowych glonów ZTT-3 o stężeniu chlorofilu wynoszącym $14 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$ i hodowano w kolbach o pojemności 250 mL, wytrząsanych w celu napowietrzenia (120 obr./min) przez 14 dni, przy natężeniu światła białego wynoszącym $70 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, w fotoperiodzie 16 h światła, 8 h ciemności i w temp. 23°C .

Po 7 dniach do wariant zawierającego konsorcjum ZTT-3 doszczepiano biomasę glonów *Chl. sorokiniana*, uzyskaną z odwirowania 40 mL hodowli o stężeniu chlorofilu $14 \mu\text{g/mL}$. W kolejnych dniach (1, 7, i 14) prowadzonego doświadczenia analizowano stężenie jonów NH_4^+ , PO_4^{3-} oraz oznaczano chemiczne zapotrzebowanie tlenu (ChZT) (szczegóły w punkcie 3.2.4.11). Stężenie chlorofilu w acetonowych ekstraktach mierzono spektrofotometrycznie [Lichtenthaler 1987]. Zdjęcia mikroskopowe wykonano za pomocą kamery cyfrowej DLT-CAM Basic 2MP (Delta Optical Sp.J., Polska).

Opisana w tym punkcie część badań prowadzona była w ścisłej współpracy z grupą badawczą kierowaną przez prof. Przemysława Malca, WBBiB, UJ w Krakowie.

3.2.4.8 Badania oczyszczanie ścieków po fermentacji metanowej z wykorzystaniem bakterii i drożdży

Odcieki po fermentacji metanowej poddano oczyszczaniu w modelowych badaniach laboratoryjnych poprzez inkubację 20 mL próbek w 100 mL kolbach stożkowych w temperaturze 25°C , z wytrząsaniem obrotowym (130 obrotów na minutę) w celu zapewnienia napowietrzenia umożliwiającego tlenowy wzrost mikroorganizmów. Standardowa analiza biologicznego oczyszczania trwała 7 dni. Ze względu na odmienną charakterystykę odcieków,

zastosowano zindywidualizowane podejścia do oczyszczania poszczególnych próbek. Kierowano się stosunkiem C:N, toksycznością odcieku i podatnością na mikrobiologiczne oczyszczanie.

Wykonano następujące warianty doświadczalne:

1. doświadczenie kontrolne ze szczepami autochtonicznymi występującymi w poszczególnych rodzajach odcieków (bez inokulacji) – zastosowano w przypadku **odcieków modelowych (A, B, C+D i E)** i pochodzących z instalacji produkcji biogazu (**BB, KK i BSZ**).
2. wariant uwzględniający zaszczepianie odcieków biomasą drożdży, Do badań wybrano te szczepy, które w ramach wcześniej przeprowadzonych testów toksyczności wykazały wysoką przeżywalność, to znaczy tolerowały środowisko odcieków – zastosowano w przypadku odcieków modelowych (**A, B, C+D i E**) i pochodzących z instalacji produkcji biogazu (**BB, KK**).
3. oczyszczanie **odcieków modelowych (A, B, C+D i E)** oraz **odcieku BB** otrzymanego po biometanizacji osadów ściekowych, biopreparatem środowiskowym ZB-01 w stosunku 9:1. Przed dodaniem do odcieku biopreparat był inkubowany w pożywce minimalnej zawierającej jedynie sole mineralne (opisane powyżej), w celu poddania presji głodowej drobnoustrojów w nim zawartych.
4. oczyszczanie **odcieku BSZ** otrzymanego po zgazowaniu gnojowicy świńskiej, poprzez bioagumnetację konsorcjum BLL.
5. wariant z mieszaną biocenozą bakteryjno-drożdżową stosowany do oczyszczania **odcieku BB**. Komponent bakteryjny stanowił biopreparat ZB-01. Testowano dwa szczepy drożdży: *Trichosporon* sp. oraz *Candida* sp. D11. Szczepy drożdży, podobnie jak biopreparat bakteryjny ZB-01 wcześniej namnażano i mieszano bezpośrednio przed eksperymentem. Komponent mikrobiologiczny stanowił 10% objętości końcowej mieszaniny inkubacyjnej. Jako kontrole stosowano odciek rozcieńczony w stosunku 9:1 podłożem YCU.
6. Wstępne oczyszczanie **odcieku BB** przy użyciu mikroalg (szczegóły w pkt. 3.2.4.7.). Odciek po oczyszczeniu wstępnym był następnie inkubowany z osadem czynnym pochodzącym z oczyszczalni biologicznej, aby sprawdzić czy zmianie uległ stopień jego toksyczności (odciek przed oczyszczeniem mikroalgami wykazywał toksyczność względem osadu czynnego). Oznaczono również parametry odcieku przed i po 7 dniowej inkubacji z osadem czynnym, w celu określenia stopnia eliminacji zanieczyszczeń, a w szczególności azotu amonowego.

7. Opracowany dodatkowy wariant obejmujący zabiegi biostymulacyjne w celu zwiększenia aktywności bioremediacyjnej drożdży *Trichosporon* sp. Drożdże te jako jedyne były zdolne do aktywnej eliminacji azotu amonowego w **odcieku KK**. Jednakże w warunkach stwierdzonego niewielkiego dostępu źródeł węgla modulowano proporcje C:N poprzez suplementację dodatkowymi źródłami węgla w celu zwiększenia wydajności przyswajania związków azotu.

3.2.4.9 Oczyszczanie ścieków fermentacji ciemnej

Odcieki ciemnej fermentacji poddano oczyszczaniu w modelowych badaniach laboratoryjnych w warunkach analogicznych do prowadzonych testów biooczyszczania cieczy po biometanizacji substratów, to znaczy prowadząc 7-dniową inkubację próbek o obj. 20 mL w 100 mL kolbach stożkowych, w temperaturze 25°C, z wytrząsaniem obrotowym (130 obr./min) zapewniającym warunki tlenowego wzrostu drobnoustrojów. Zastosowano trzy warianty doświadczalne:

1. wariant kontrolny, w którym badano aktywność wyłącznie szczepów autochtonicznych występujących w poszczególnych rodzajach ścieków (odcieki nieszczepione dodatkowo bakteriami allochtonicznymi);
2. Biologiczne oczyszczanie przy użyciu izolatu drożdżowego *Yarrowia lipolytica* (zastosowano w przypadku odcieku MP+)



Ryc. 15. Szalka przedstawiająca kolonie drożdży *Yarrowia lipolytica* zastosowanych do bioremediacji odcieku MP+

3. Zaszczepienie konsorcjum drobnoustrojów wytworzonym na bazie autochtonicznych drobnoustrojów wyizolowanych wcześniej z wszystkich rodzajów badanych cieczy pofermentacyjnych. Hodowle wstępne prowadzono przez 72 godziny w 20 mL podłoża SNB (bakterie) lub YCU (drożdże) w temperaturze pokojowej przy wytrząsaniu obrotowym 130 obr./min), a następnie wirowano przez 10 min z prędkością odpowiednio: 7000 obr./min lub 3500 obr./min dla bakterii i drożdży. Wszystkie otrzymane osady komórek dodano bezpośrednio do 20 mL próbek ścieków, delikatnie wymieszano w celu uzyskania jednorodnych zawiesin i umieszczono na wytrząsarce obrotowej (wytrząsanie jak wyżej), po czym rozpoczęto test biodegradacji.

Podczas prowadzenia obserwacji, wszystkie próbki badano pod kątem liczebności drobnoustrojów w celu monitorowania gęstości biomasy na początku eksperymentu (t_0), a następnie po 1, 3 i 7 dniach traktowania (odpowiednio t_1 , t_3 i t_7). Po zakończeniu inkubacji, próbki ścieków były poddane analizom w celu określenia poziomu chemicznego zapotrzebowania tlenu (ChZT), całkowitej zawartości lotnych kwasów tłuszczowych (TVFA), ogólnego azotu i fosforu.

3.2.4.10 Diagnostyka mikrobiologiczna metodą analizy proteomicznej

Mikrobiologicznie czyste szczepy, przeznaczone do pełnej identyfikacji gatunkowej hodowano w płynnym podłożu optymalnym po zaszczepieniu jedną wyodrębnioną kolonią bezpośrednio z szalki Petri'ego. Drobnoustroje zostały wcześniej scharakteryzowane techniką barwienia Grama (patrz: pkt. 3.2.4.3 i 3.2.4.4). Następnie, poszczególne izolaty były ponownie posiewane na podłoża zestalone agarom i przekazywane do molekularnej identyfikacji proteomicznej za pomocą analizatora Bruker Biotyper®. Analizy wykonywano na zlecenie w Laboratorium Mikrobiologicznym, Jagiellońskiego Centrum Innowacji w Krakowie.

Zastosowana technika diagnostyczna, opracowana przez firmę Bruker Daltonics GmbH & Co. KG (Niemcy), opiera się na zautomatyzowanym systemie nowej generacji pozwalającym na jednoznaczną identyfikację drobnoustrojów dzięki analizie metodą spektrometrii masowej z wykorzystaniem desorpcji/ionizacji laserowej wspomaganą matrycą (MALDI –TOF MS) [Singhal i in. 2015].

Otrzymane dane proteomiczne były reprezentowane przez unikalne profile pików (widma masowe) „odcisków palców” i następnie poddane dopasowaniu do bazy danych widm masowych wersji K Bruker MBT IVD Library (wydanie bazy danych z 2020 r.). Dokładność (jednoznaczność) identyfikacji mikroorganizmów oceniano za pomocą współczynnika identyfikacji (IF) obliczanego jako wartość zlogarytmowaną w zakresie od 0 do 3. Uzyskany parametr IF pozwolił na określenie podobieństwa profilu do odpowiednich widm referencyjnych w obrębie wpisów bazy danych.

Tożsamość każdego szczepu określano na podstawie uzyskanej wartości IF i oceniano ilościowo przy użyciu następujących kryteriów: $IF > 2,0$: identyfikacja o wysokim stopniu pewności; dla IF w zakresie od 1,7 do 1,99: identyfikacja o niskiej pewności; $IF < 1,7$: brak możliwości dokonania dokładnej identyfikacji. Następnie, informacja o dopasowanych i zidentyfikowanych gatunkach drobnoustrojów została skierowana do bazy danych taksonomii National Center for Biotechnology Information (NCBI) zarządzanej przez NCBI/GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>). Na koniec, każdy szczep otrzymał określony numer identyfikacyjny taksonomii NCBI.

3.2.4.11 Archiwizacja szczepów przydatnych w kolekcji drobnoustrojów środowiskowych

Wszystkie wyizolowane szczepy zabezpieczono przez zdeponowanie w kolekcji drobnoustrojów środowiskowych Zespołu Biochemii w temperaturze -80°C do dalszego wykorzystania. Bank izolatów utworzono przy użyciu systemu Microbank™ (Pro-Lab Diagnostics, Toronto, Kanada www.pro-lab.com) w oparciu o zestaw kriofiolek zawierających porowate perełki służące jako nośniki dla drobnoustrojów, zanurzone w roztworze kriokonserwującym.

3.2.4.12 Metody analityczne

Wartości ChZT, zawartość kwasów organicznych (TVFA ang. *Total volatile fatty acids*), azotu ogólnego, azotu amonowego i fosforu w próbkach ścieków oznaczano za pomocą zautomatyzowanego, spektrofotometrycznego modułu mineralizacyjno-analitycznego HACH-LANGE (Hach-Lange GmbH, Düsseldorf, Niemcy) wyposażonego w spektrofotometr Hach DR 5000 UV-Vis i Dry Termostat LT200 jako urządzenie do mineralizacji, stosując odpowiednie testy kuwetowe LCK (tab. 9) zgodnie z zaleceniami producenta. Zawartość TVFA obejmowała głównie kwas octowy, propionowy i butanowy (C2 – C4) i została wyrażona jako równoważnik kwasu octowego w [mg/L].

Tabela 9. Zestawienie testów LCK z podaniem zakresów oznaczalności analitów

Rodzaj testu LCK	Oznaczone substancje/ parametry	Zakres
LCK 314	ChZT	15–150 mg/L O ₂
LCK 514		100–2000 mg/L O ₂
LCK 914		5–60 g/L O ₂
LCK 265	Kwasy organiczne	50–2500 mg/L
LCK 304	Azot amonowy (NH ₄ ⁺ -N)	2–47 mg/L
LCK 338	Azot ogólny (N _{og.})	20–100 mg/L
LCK 348	Fosfor ogólny (P _{og.})	0,5–5,0 mg/L
LCK 340	Azotany (NO ₃ ⁻ /NO ₂ ⁻ -N)	5–35 mg/L

3.2.4.13 Analiza statystyczna wyników

Wszystkie wyniki podano jako wartości średnie ± odchylenie standardowe. Ocenę statystyczną przeprowadzono za pomocą jednoczynnikowego modułu ANOVA programu Statistica 13.3 (StatSoft Polska, Kraków, Polska) na poziomie progu istotności $p \leq 0,05$. Testy t-studenta oraz Scheffe'a wykorzystano do określenia istotności statystycznej różnic między stężeniami poszczególnych związków ocenianych w testach wariantowych. Umieszczone w tabelach w sekcji wyniki (Rozdział 4) średnie znajdujące się w danym wierszu, oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy poziomie istotności $p = 0,05$.

4. Wyniki badań

4.1 Badania odcieków powstałych w wyniku fermentacji metanowej w laboratoryjnej instalacji modelowej

4.1.1 Analiza fizykochemiczna i mikrobiologiczna odcieków

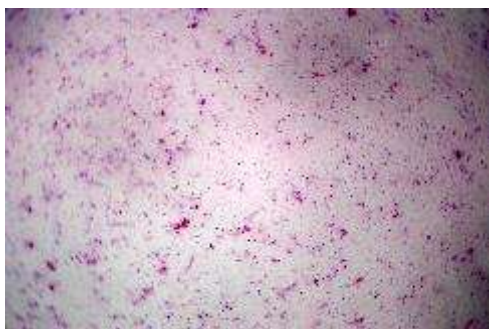
W pierwszym etapie badań, analizowano ciecze pofermentacyjne otrzymane w procesach biometanizacji różnych substratów (osadów ściekowych, ścieków poubojowych, wysłodków buraczanych i pomiotu kurzego) w modelowej instalacji produkcji biogazu przygotowanych przez współpracujący zespół Katedry Biotechnologii Środowiskowej, Politechnika Łódzka pod kierunkiem prof. Sebastiana Borowskiego. Nazwy poszczególnych odcieków pochodzą od surowca, który był wykorzystany w procesie fermentacji (osady ściekowe, ścieki poubojowe, wysłodki buraczane, pomiot kurzy).

Wstępna charakterystyka surowych cieczy pofermentacyjnych pozyskanych z laboratoryjnej instalacji produkcji biogazu ChZT została przedstawiona w tabeli nr 10. Przeprowadzone analizy zawartości azotu amonowego, fosforanów oraz ChZT wykazały, że wartości poszczególnych parametrów różniły się w zależności od surowca, na bazie którego powstał dany odciek oraz, że w każdej z przebadanych cieczy stężenie azotu amonowego było wysokie, mieszcząc się w zakresie od 884,5 mg/L (osady ściekowe) do 3070 mg/L (pomiot kurzy). Wartość ta kilkudziesięciokrotnie, a w przypadku odcieku E ponad stukrotnie przekracza obowiązujące normy (norma dla azotu ogólnego ($N_{og.}$) wynosi w ściekach 30 mg/L – zgodnie z rozporządzeniem [Rozporządzenie Ministra Gospodarki Morskiej i Żeglugi Śródlądowej 2019]). W przypadku fosforu wartości te wahały się znacząco pomiędzy poszczególnymi odciekami i wynosiły od 27 mg/L do 502,5 mg/L. Norma dla fosforu wynosi 10 mg/L, zatem wartości fosforu w odciekach w każdym przypadku były przekroczone, jednakże przekroczenia te nie były tak wysokie jak w przypadku azotu [Rozporządzenie Ministra Gospodarki Morskiej i Żeglugi Śródlądowej 2019]. Ciecze charakteryzowały się również wysoką zmiennością obciążenia związkami organicznymi, wyrażonymi jako ChZT (od 1194,5 mg O_2/L (osad ściekowy) a 18435 mg O_2/L (ścieki poubojowe).

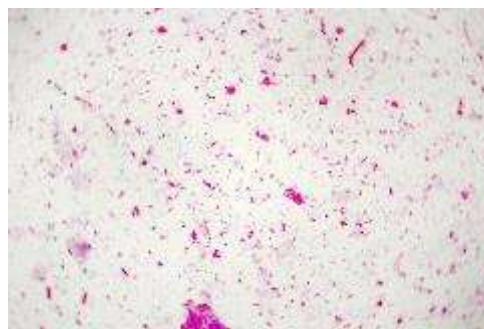
Tabela 10. Wstępna charakterystyka surowych cieczy pofermentacyjnych pozyskanych z laboratoryjnej instalacji produkcji biogazu obejmująca zawartość azotu i fosforu oraz poziom ChZT

Nazwa odcieku	Oznaczany parametr	Wartość
A – osady ściekowe	ChZT	1194,50 ± 25,50 mg O ₂ /L
	NH ₄ ⁺ – N	884,50 ± 24,50 mg/L
	PO ₄ ³⁻ – P	193,50 ± 18,50 mg/L
B – ścieki poubojowe	ChZT	18435,00 ± 2865,00 mg O ₂ /L
	NH ₄ ⁺ – N	1810,00 ± 30,00 mg/L
	PO ₄ ³⁻ – P	502,5 ± 0,50 mg/L
C+D – wysłodki buraczane	ChZT	3759,00 ± 19,00 mg O ₂ /L
	NH ₄ ⁺ – N	992,5 ± 7,50 mg/L
	PO ₄ ³⁻ – P	27,00 ± 2,40 mg/L
E – pomiot kurzy	ChZT	7255,00 ± 235,00 mg O ₂ /L
	NH ₄ ⁺ – N	3110 ± 40,00 mg/L
	PO ₄ ³⁻ – P	75,90 ± 0,30 mg/L

Ciecze pofermentacyjne badano pod kątem obecności drobnoustrojów autochtonicznych. Dla każdego z odcieków (A, B, C+D i E) wykonano barwienie metodą Grama (ryc. 16 przedstawia zdjęcia mikroskopowe wybarwionych preparatów poszczególnych odcieków), co pozwoliło określić jakościowo mikrobiotę autochtoniczną. Wykonano również posiewy mikrobiologiczne odcieków metodą płytkową Kocha, w celu określenia liczebności drobnoustrojów w nich zawartych. W wyniku przeprowadzonych analiz wykazano, iż w cieczach pofermentacyjnych znajdują się liczne gram dodatnie i gram ujemne bakterie autochtoniczne (liczebność rzędu 10⁷ jtk/mL, tab. 11).



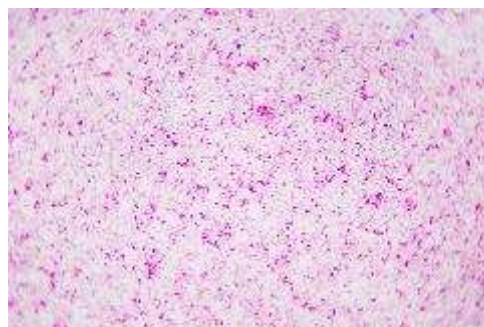
odciek A



odciek B



odciek C+D



odciek E

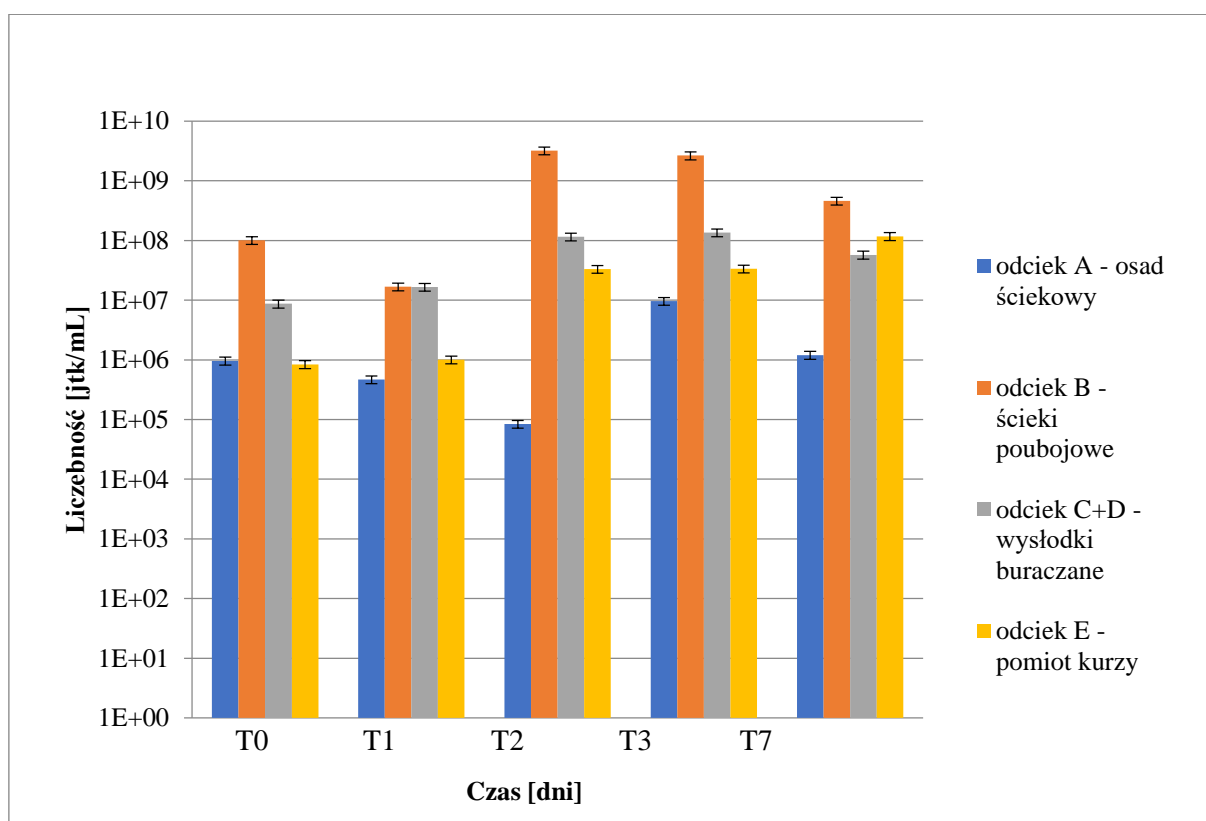
Ryc. 16. Obrazy mikroskopowe odcieków poddanych barwieniu Grama, pow. 1000x

Tabela 11. Liczebność mikroorganizmów autochtonicznych w cieczech pofermentacyjnych

Nazwa odcieku	Liczebność bakterii autochtonicznych [jtk/mL]
A – osady ściekowe	$2,19 \cdot 10^7 \pm 3,10 \cdot 10^5$
B – ścieki poubojowe	$5,26 \cdot 10^7 \pm 2,05 \cdot 10^5$
C+D – wysłodki buraczane	$1,32 \cdot 10^7 \pm 5,50 \cdot 10^5$
E – pomiot kurzy	$1,26 \cdot 10^7 \pm 1,57 \cdot 10^5$

4.1.2 Określenie potencjału mikrobioty autochtonicznej w usuwaniu zanieczyszczeń

Odcieki poddano 7-dniowej inkubacji w warunkach napowietrzania, w celu określenia potencjału mikroorganizmów autochtonicznych do usuwania zanieczyszczeń znajdujących się w poszczególnych cieczach pofermentacyjnych. W wyniku przeprowadzonego doświadczenia zaobserwowano wzrost drobnoustrojów autochtonicznych w przypadku każdego z odcieków (ryc. 17), co świadczy o ich potencjale do namnażania się w środowisku odcieków w optymalnych do ich wzrostu warunkach (wyższe natlenienie).



Ryc. 17. Dynamika populacji bakterii autochtonicznych podczas inkubacji odcieków A, B, C+D i E w warunkach napowietrzania przez okres 7 dni

Na początku i na końcu eksperymentu wykonano pomiary ChZT, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ oraz $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$ (tab. 12). Stężenie azotu amonowego w odciekach po zakończeniu doświadczenia uległ w każdym przypadku znacznemu obniżeniu (spadek kolejno o 85% – odciek A, 45% – odciek B, 93% – odciek C+D, 75% – odciek E). Tak wysoki stopień redukcji azotu amonowego świadczy o wysokim potencjale mikroorganizmów autochtonicznych w usuwaniu tego rodzaju związków.

W żadnym z badanych odcieków nie zaobserwowano jednak spadku zawartości PO_4^{3-} – P i poziomu ChZT w związku w kolejnym etapie odcieki poddano bioaugmentacji biopreparatem ZB-01.

Tabela 12. Wyniki analiz wybranych zanieczyszczeń w odciekach pofermentacyjnych przed inkubacją (wartości dla odcieków surowych, jak w tab. 10) i po 7-dniowej inkubacji z mikroorganizmami autochtonicznymi

Nazwa odcieku	Oznaczany parametr	Wartość – T0 ściek wirowany [mg/L]	Wartość – T7 ściek po inkubacji [mg/L]
A – osad ściekowy	ChZT	1194,50 ± 25,50 a	1350,00 ± 40,00 b
	NH_4^+ – N	884,50 ± 24,50 a	135,00 ± 10,00 b
	PO_4^{3-} – P	193,50 ± 18,50 a	207,00 ± 2,65 a
B – ścieki poubojowe	ChZT	18435,00 ± 2865,00 a	16850,00 ± 180,23 b
	NH_4^+ – N	1810,00 ± 30,00 a	1000,00 ± 20,00 b
	PO_4^{3-} – P	502,50 ± 0,50 a	531 ± 8,54 a
C+D – wysłodki buraczane	ChZT	3759,00 ± 19,00 a	3711,67 ± 40,10 a
	NH_4^+ – N	992,50 ± 7,50 a	66,00 ± 5,29 b
	PO_4^{3-} – P	27,00 ± 2,40 a	27,13 ± 2,01 a
E – pomiot kurzy	ChZT	7255,00 ± 235,00 a	6930 ± 60,83 a
	NH_4^+ – N	3110,00 ± 40,00 a	789,33 ± 9,01 b
	PO_4^{3-} – P	75,90 ± 0,30 a	81,00 ± 8,19 a

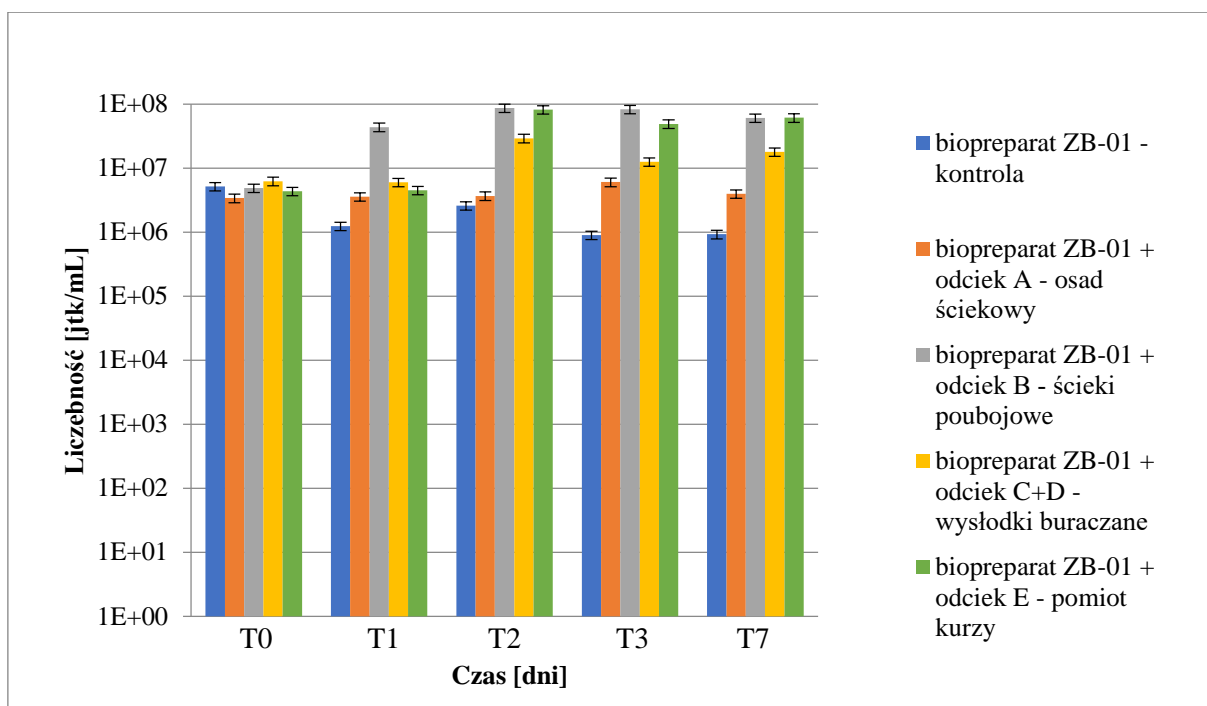
4.1.3 Testy toksyczności cieczy pofermentacyjnych i analizy oczyszczania z użyciem biopreparatu ZB-01

W celu eliminacji wpływu drobnoustrojów autochtonicznych na proces oczyszczania cieczy pofermentacyjnych przez drobnoustroje allochtoniczne, konsorcja mikrobiologiczne i osady czynne, dalsze eksperymenty przeprowadzono z wykorzystaniem próbek odcieków po odwirowaniu.

W kolejnych etapach zastosowano biopreparat ZB-01, opracowany przez Zespół Biochemii w ramach prac nad bioremediacją zanieczyszczeń węglowodorowych. Jest to bioróżnorodne konsorcjum drobnoustrojów izolowanych ze środowisk zanieczyszczonych antropogenicznie.

W wyniku przeprowadzonych testów toksyczności wykazano (ryc. 18), że drobnoustroje biopreparatu ZB-01 są zdolne do przeżycia i proliferacji w środowisku badanych cieczy pofermentacyjnych. Podobnie jak w badaniach wcześniejszych, oznaczono poziom pierwiastków biogennych i wartość ChZT przed i po inkubacji z biopreparatem. Drobnoustroje zdolne były do znaczącego obniżenia poziomu głównego zanieczyszczenia odcieków czyli azotu amonowego (odpowiednio o 80% dla odcieku A, 55% dla odcieku B,

93% dla odcieku C+D i 87% dla odcieku E) (tab. 13). Poziom ChZT i zawartość fosforu nie uległa z kolei zmniejszeniu, a w niektórych przypadkach obserwowany był wzrost tych parametrów, co wiąże się z wprowadzeniem gęstwy biopreparatu ZB-01 do odcieków.



Ryc. 18. Wyniki analiz toksyczności odcieków pofermentacyjnych względem drobnoustrojów biopreparatu ZB-01. Kontrola – biopreparat ZB-01 inkubowany w płynnym podłożu minimalnym (słupki niebieskie – kontrola, pozostałe słupki – poszczególne odcieki + biopreparat)

Tabela 13. Ocena efektywności usuwania związków biogenych i zanieczyszczeń organicznych z odcieków pofermentacyjnych przez biopreparat ZB-01. T0 – początek doświadczenia, T7 – analizy po 7-dniowej inkubacji

Nazwa odcieku	Oznaczany parametr	Wartość – T0 ściek wirowany [mg/L]	Wartość – T7 ściek po inkubacji [mg/L]
A – osad ściekowy	ChZT	975,00 ± 25,00 a	1035,00 ± 5,00 a
	NH ₄ ⁺ – N	830,00 ± 17,32 a	164,67 ± 5,03 b
	PO ₄ ³⁻ – P	167,67 ± 8,02 a	161,67 ± 1,15 a
B – ścieki poubojowe	ChZT	3710,00 ± 50,74 a	5490,00 ± 36,06 b
	NH ₄ ⁺ – N	1770,00 ± 60,83 a	814,67 ± 12,86 b
	PO ₄ ³⁻ – P	496,00 ± 6,66 a	477,00 ± 23,43 a
C+D – wysłodki buraczane	ChZT	2075,00 ± 8,66 a	2030,00 ± 30,00 a
	NH ₄ ⁺ – N	985,67 ± 5,13 a	63,50 ± 1,00 b
	PO ₄ ³⁻ – P	8,07 ± 1,52 a	21,83 ± 1,76 b

E – pomiot kurzy	ChZT	4040,00 ± 16,46 a	7733,33 ± 30,55 b
	NH ₄ ⁺ – N	3153,33 ± 55,08 a	402 ± 27,51 b
	PO ₄ ³⁻ – P	51,40 ± 0,87 a	131,67 ± 12,58 b

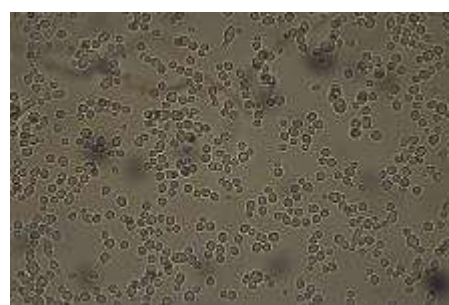
4.1.4 Badanie toksyczności odcieków względem drożdży i określenie potencjału wybranych szczepów w usuwaniu zanieczyszczeń

Odcieki pofermentacyjne pochodzące z instalacji laboratoryjnej testowano również po zaszczepleniu hodowlami wybranych szczepów drożdży konwencjonalnych (*Saccharomyces cerevisiae*) i niekonwencjonalnych (*Candida* sp. D11, *Hansenula polymorpha*, *Trichosporon* sp.), pochodzących z kolekcji Zespołu Biochemii (ryc. 19).

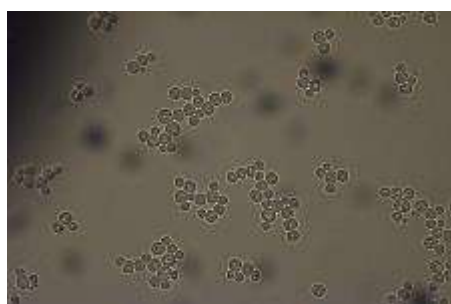
Testy toksyczności wykazały zróżnicowaną zdolność drożdży do przeżywania w środowisku poszczególnych odcieków (ryc. 20 – 35). Szczepy *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* sp. D11 i *Hansenula polymorpha* nie były zdolne do przetrwania 7-dniowej inkubacji w żadnej z cieczy pofermentacyjnych. Szczep *Trichosporon* sp. natomiast wykazywał tolerancję na odciek A oraz odciek C+D, aczkolwiek jego liczebność po inkubacji była znacząco niższa w stosunku do kontroli, którą stanowiła biomasa drożdży inkubowana w podłożu minimalnym.



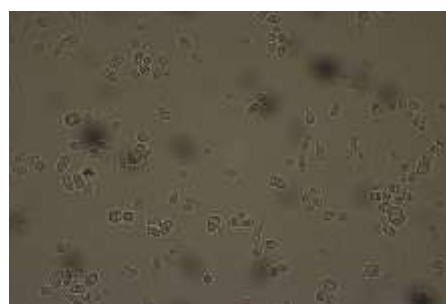
Hansenula polymorpha



Candida sp. D11

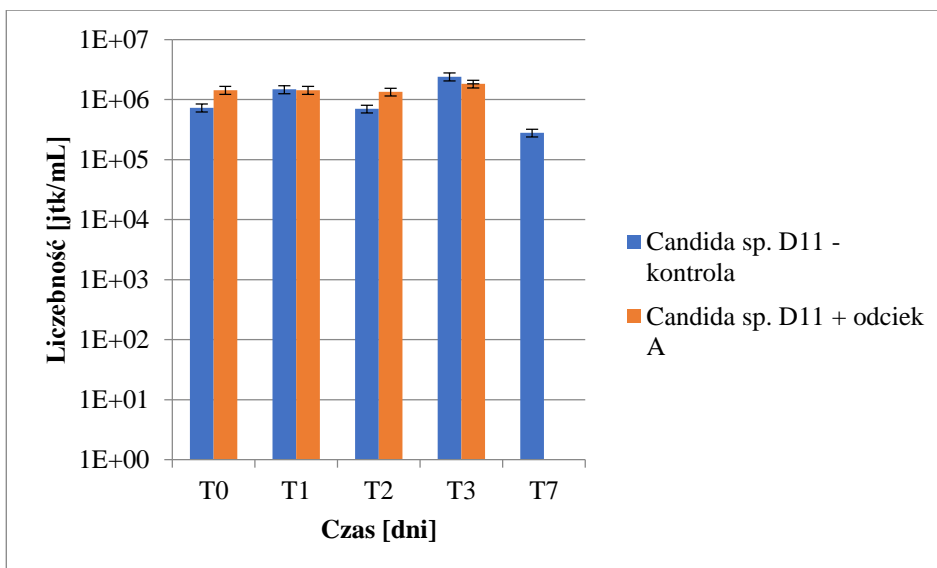


Saccharomyces cerevisiae

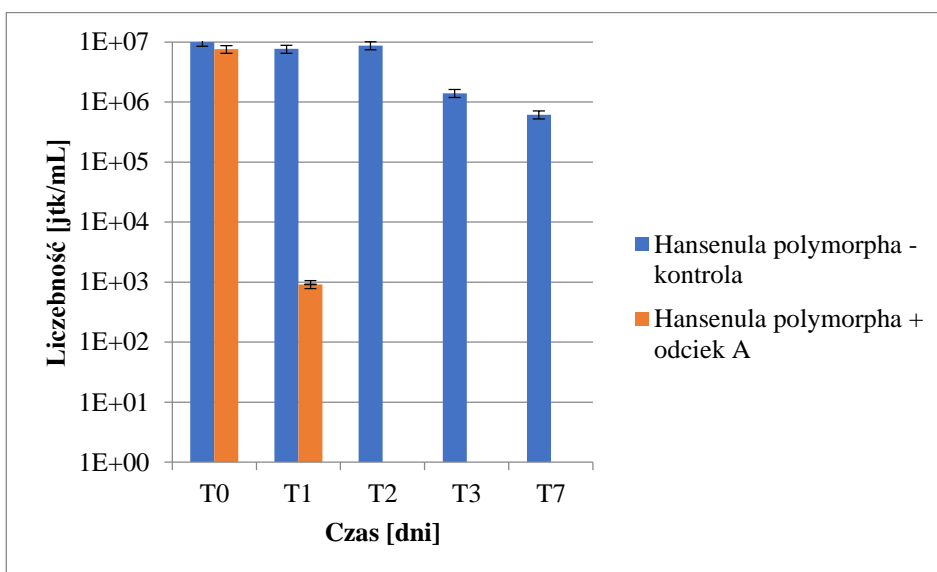


Trichosporon sp.

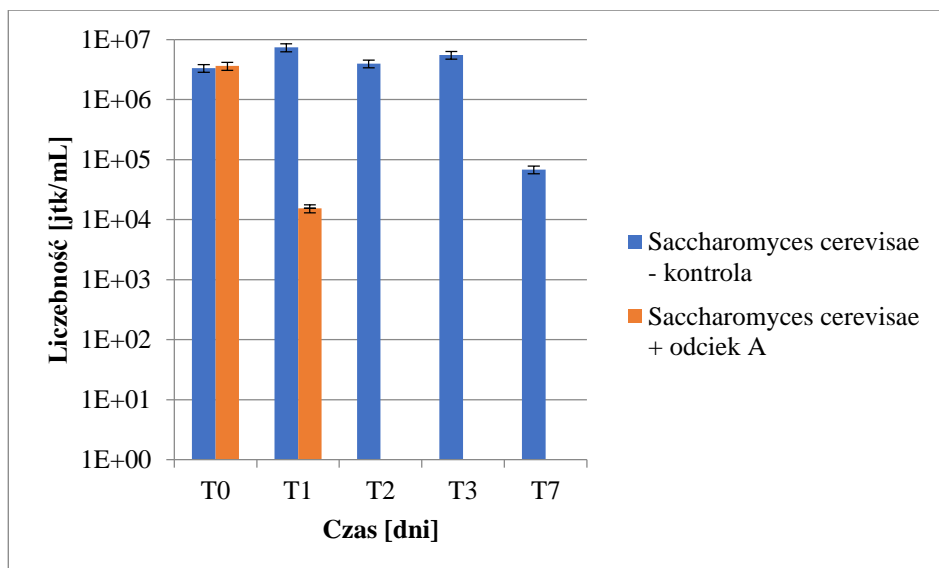
Ryc. 19. Zdjęcia mikroskopowe hodowli badanych drożdży, pow. 1000x



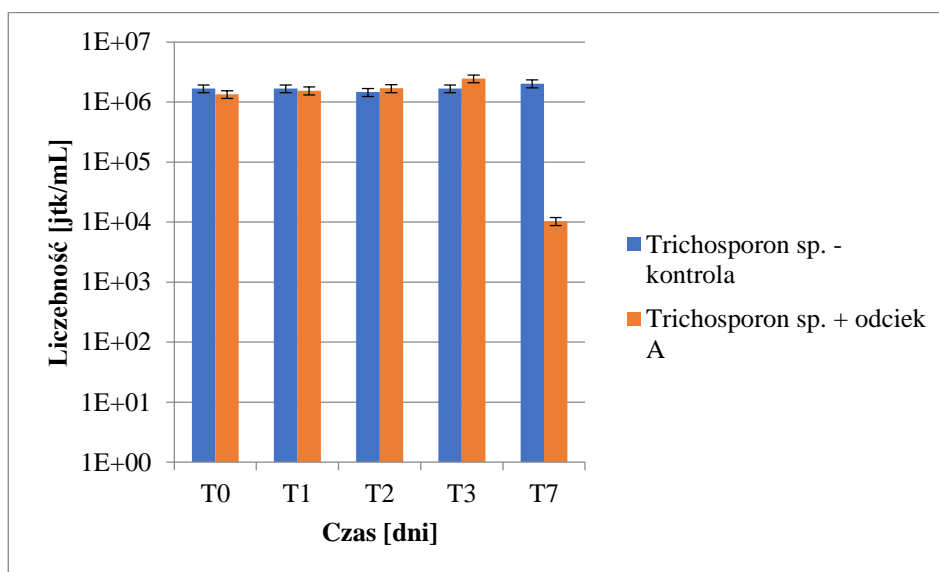
Ryc. 20. Dynamika populacji drożdży *Candida* sp. D11 (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek A + drożdże)



Ryc. 21. Dynamika populacji drożdży *Hansenula polymorpha* (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek A + drożdże)



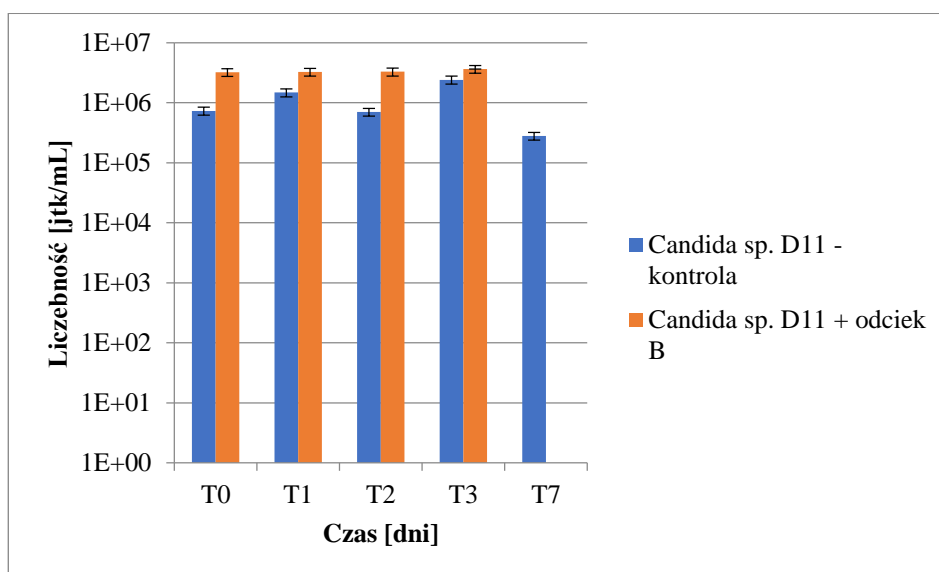
Ryc. 22. Dynamika populacji drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odcięk A + drożdże)



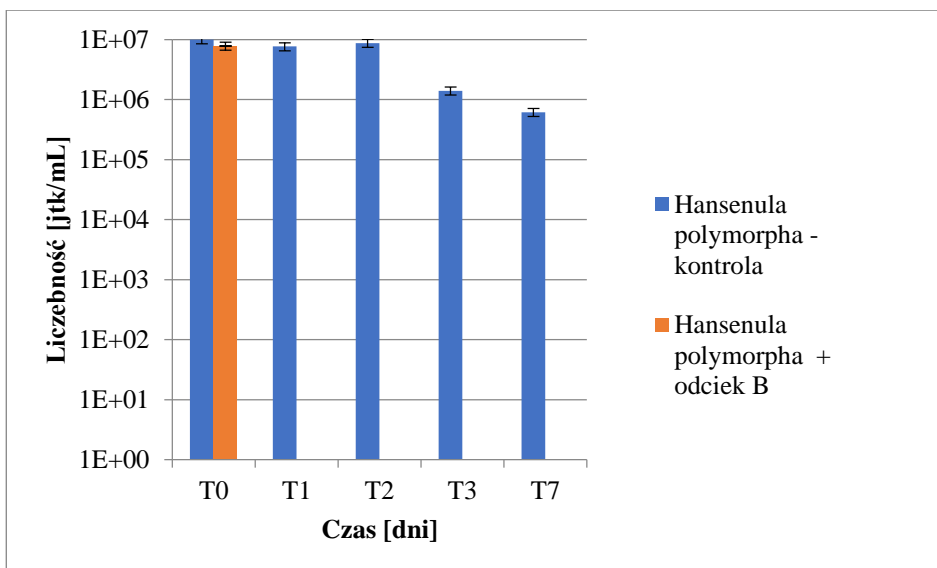
Ryc. 23. Dynamika populacji drożdży *Trichosporon sp.* (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odcięk A + drożdże)

Tabela 14. Ocena efektywności usuwania związków biogenych i zanieczyszczeń organicznych z odcieku A przez wybrane szczepy drożdży

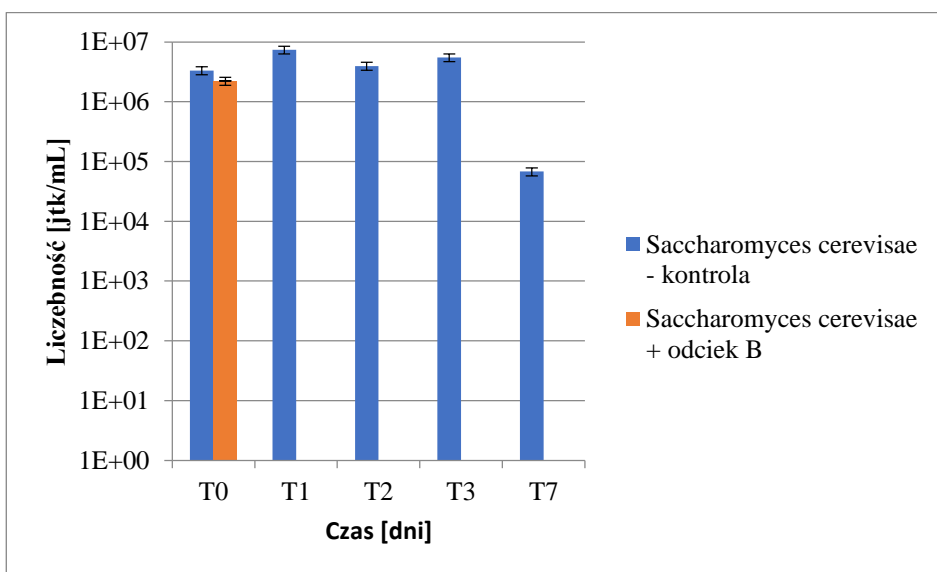
Nazwa szczepu	Oznaczany parametr	Wartość – T0 ściek zwirowany [mg/L]	Wartość – T7 ściek po inkubacji [mg/L]
<i>Candida sp. D11</i>	ChZT	975,00 ± 25,00 a	885,00 ± 5,00 b
	NH ₄ ⁺ – N	830,00 ± 17,32 a	864,33 ± 0,58 a
	PO ₄ ³⁻ – P	167,67 ± 8,02 a	155,00 ± 5,00 a
<i>Hansenula polymorpha</i>	ChZT	975,00 ± 25,00 a	1225,00 ± 66,14 b
	NH ₄ ⁺ – N	830,00 ± 17,32 a	606,00 ± 8,54 b
	PO ₄ ³⁻ – P	167,67 ± 8,02 a	189,33 ± 9,50 a
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ChZT	975,00 ± 25,00 a	1380,67 ± 20,03 b
	NH ₄ ⁺ – N	830,00 ± 17,32 a	431,00 ± 31,51 b
	PO ₄ ³⁻ – P	167,67 ± 8,02 a	155,00 ± 5,00 a
<i>Trichosporon sp.</i>	ChZT	975,00 ± 25,00 a	1555,00 ± 42,72 b
	NH ₄ ⁺ – N	830,00 ± 17,32 a	525,33 ± 0,58 b
	PO ₄ ³⁻ – P	167,67 ± 8,02 a	211,00 ± 10,15 b



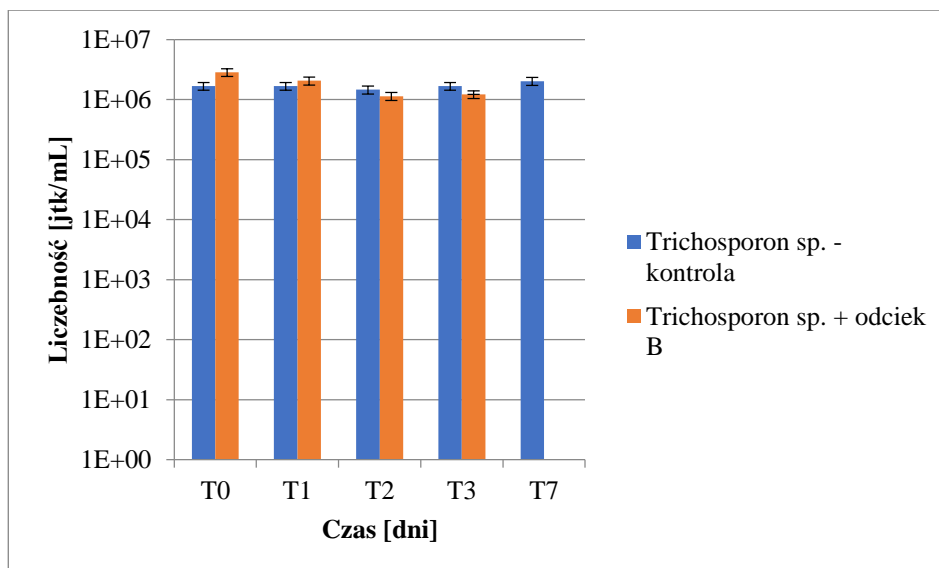
Ryc. 24. Dynamika populacji drożdży *Candida sp. D11* (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek B + drożdże)



Ryc. 25. Dynamika populacji drożdży *Hansenula polymorpha* (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek B + drożdże)



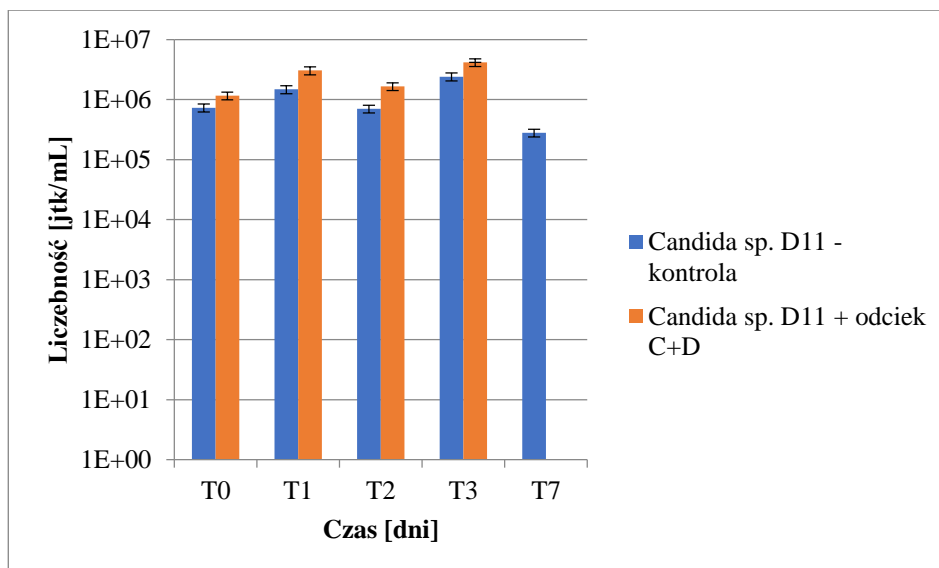
Ryc. 26. Dynamika populacji drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek B + drożdże)



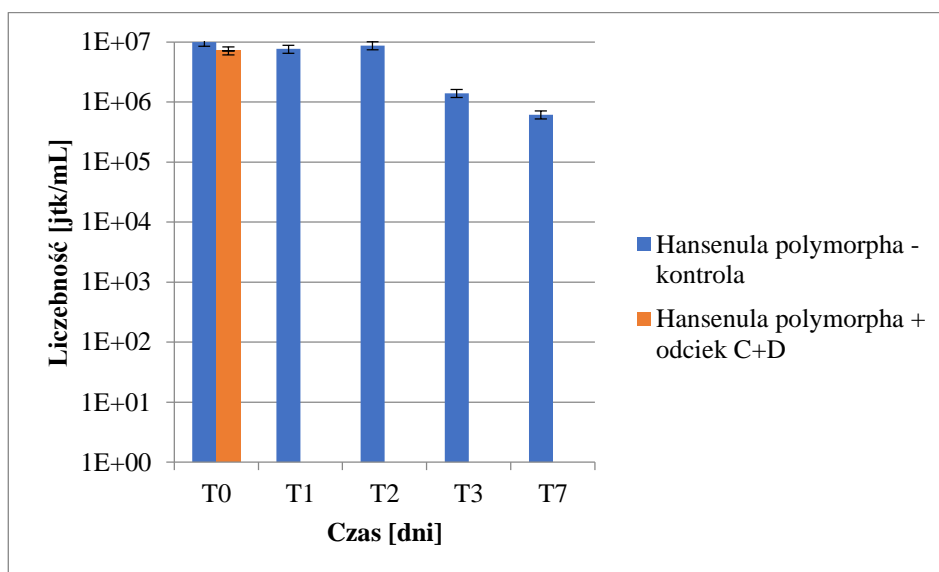
Ryc. 27. Dynamika populacji drożdży *Trichosporon sp.* (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek B + drożdże)

Tabela 15. Ocena efektywności usuwania związków biogenych i zanieczyszczeń organicznych z odcieku B przez wybrane szczepy drożdży

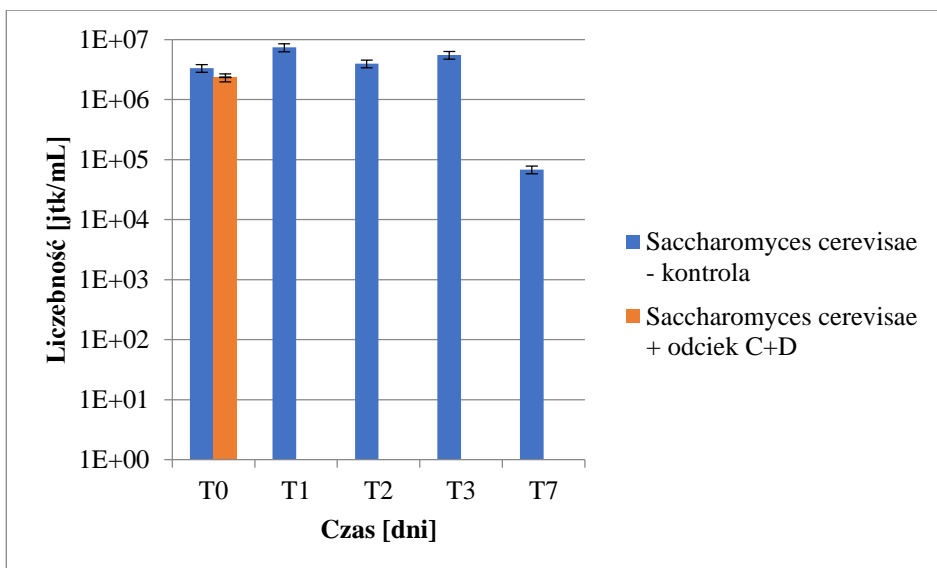
Nazwa szczepu	Oznaczany parametr	Wartość – T0 ściek zwirowany [mg/L]	Wartość – T7 ściek po inkubacji [mg/L]
<i>Candida sp. D11</i>	ChZT	3710,00 ± 50,74 a	3925,00 ± 25,00 a
	NH ₄ ⁺ – N	1770,00 ± 60,83 a	1738,00 ± 38,63 a
	PO ₄ ³⁻ – P	496,00 ± 6,66 a	434,33 ± 5,13 b
<i>Hansenula Polymorpha</i>	ChZT	3710,00 ± 50,74 a	3030,33 ± 30,50 b
	NH ₄ ⁺ – N	1770,00 ± 60,83 a	1610,00 ± 17,32 a
	PO ₄ ³⁻ – P	496,00 ± 6,66 a	492,33 ± 2,52 b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ChZT	3710,00 ± 50,74 a	3145,00 ± 47,67 b
	NH ₄ ⁺ – N	1770,00 ± 60,83 a	1020,00 ± 26,46 b
	PO ₄ ³⁻ – P	496,00 ± 6,66 a	428,33 ± 7,64 b
<i>Trichosporon sp.</i>	ChZT	3710,00 ± 50,74 a	3403,33 ± 205,02 a
	NH ₄ ⁺ – N	1770,00 ± 60,83 a	1110,00 ± 17,32 b
	PO ₄ ³⁻ – P	496,00 ± 6,66 a	486,67 ± 5,77 a



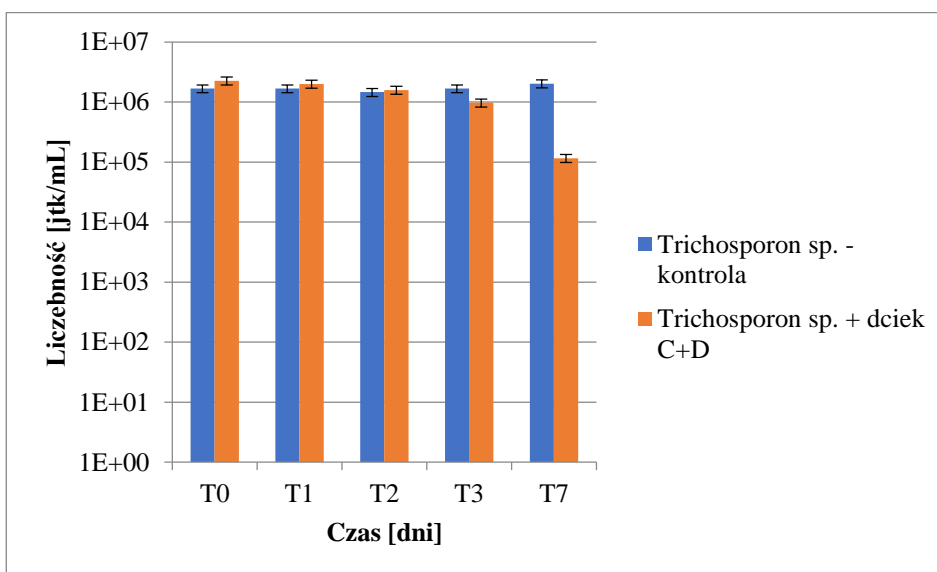
Ryc. 28. Dynamika populacji drożdży *Candida sp. D11* (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek C+D + drożdże)



Ryc. 29. Dynamika populacji drożdży *Hansenula polymorpha* (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek C+D + drożdże)



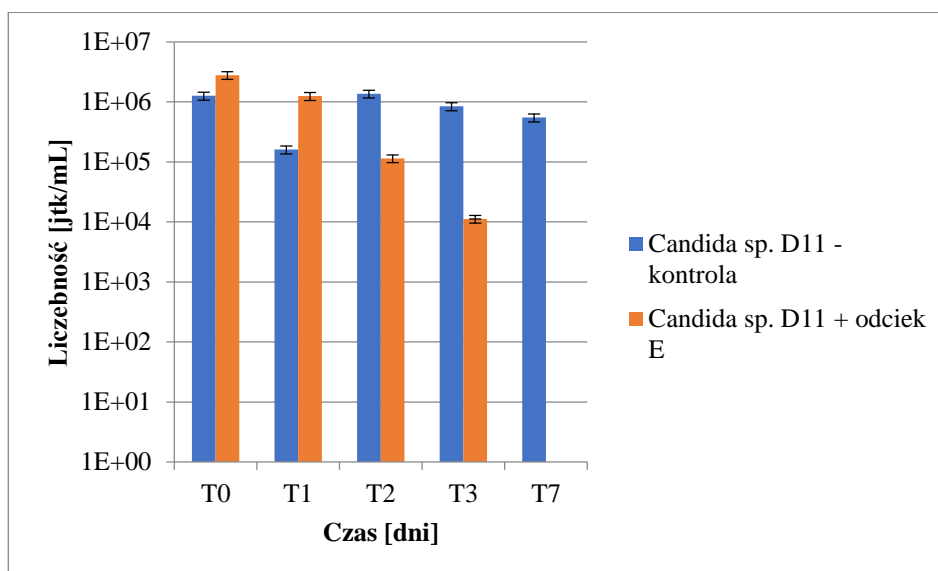
Ryc. 30. Dynamika populacji drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek C+D + drożdże)



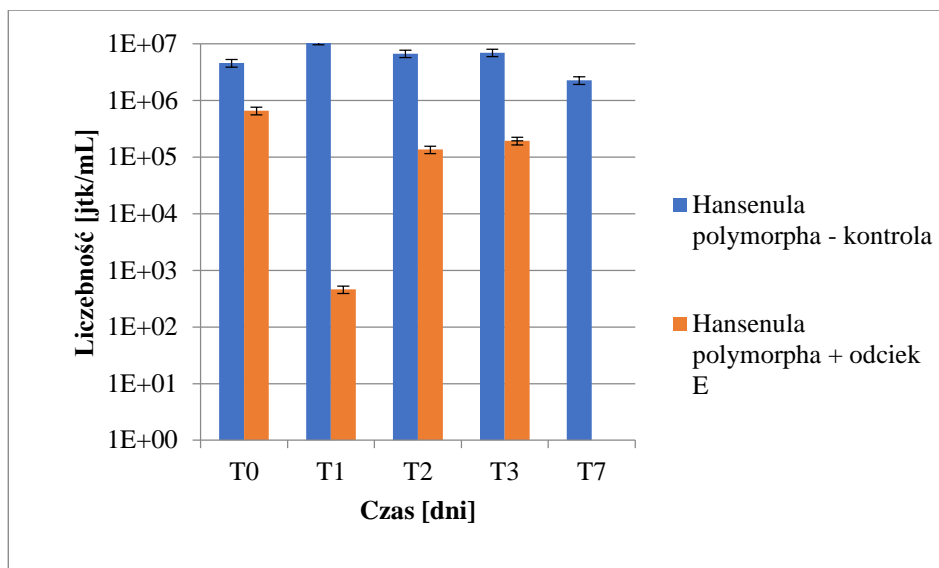
Ryc. 31. Dynamika populacji drożdży *Trichosporon sp.* (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek C+D + drożdże)

Tabela 16. Ocena efektywności usuwania związków biogenych i zanieczyszczeń organicznych z odcieku C + D przez wybrane szczepy drożdży

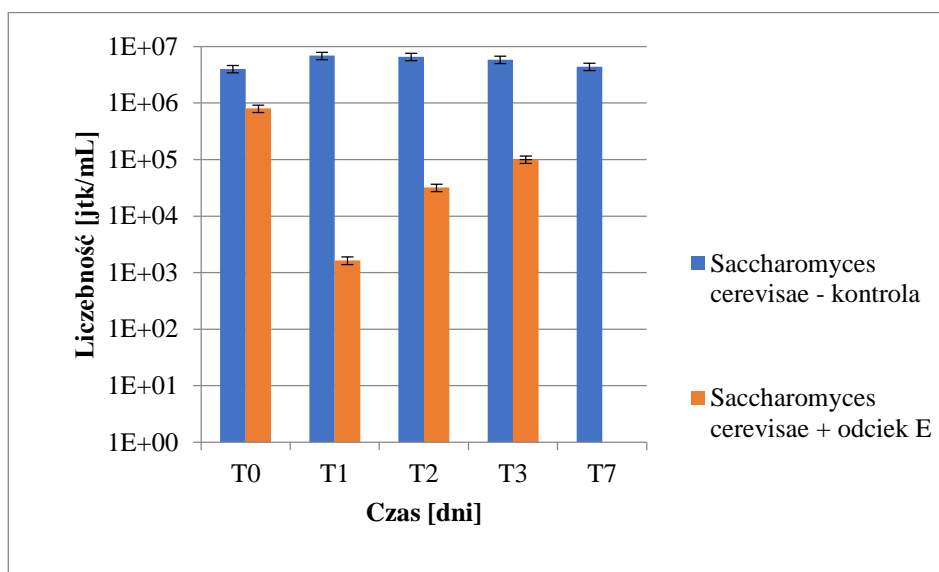
Nazwa szczepu	Oznaczany parametr	Wartość – T0 ściek zwirowany [mg/L]	Wartość – T7 ściek po inkubacji [mg/L]
<i>Candida sp. D11</i>	ChZT	2075,00 ± 8,66 a	1885,67 ± 145,25 a
	NH ₄ ⁺ – N	985,67 ± 5,13 a	575,00 ± 47,70 b
	PO ₄ ³⁻ – P	8,07 ± 1,52 a	17,27 ± 0,64 b
<i>Hansenula Polymorpha</i>	ChZT	2075,00 ± 8,66 a	2333,33 ± 325,32 a
	NH ₄ ⁺ – N	985,67 ± 5,13 a	831,67 ± 18,93 b
	PO ₄ ³⁻ – P	8,07 ± 1,52 a	18,67 ± 0,58 b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ChZT	2075,00 ± 8,66 a	2545,00 ± 50,74 b
	NH ₄ ⁺ – N	985,67 ± 5,13 a	910,00 ± 10,00 b
	PO ₄ ³⁻ – P	8,07 ± 1,52 a	23,00 ± 1,00 b
<i>Trichosporon sp.</i>	ChZT	2075,00 ± 8,66 a	2446,67 ± 45,09 b
	NH ₄ ⁺ – N	985,67 ± 5,13 a	890,00 ± 36,06 b
	PO ₄ ³⁻ – P	8,07 ± 1,52 a	25,23 ± 0,06 b



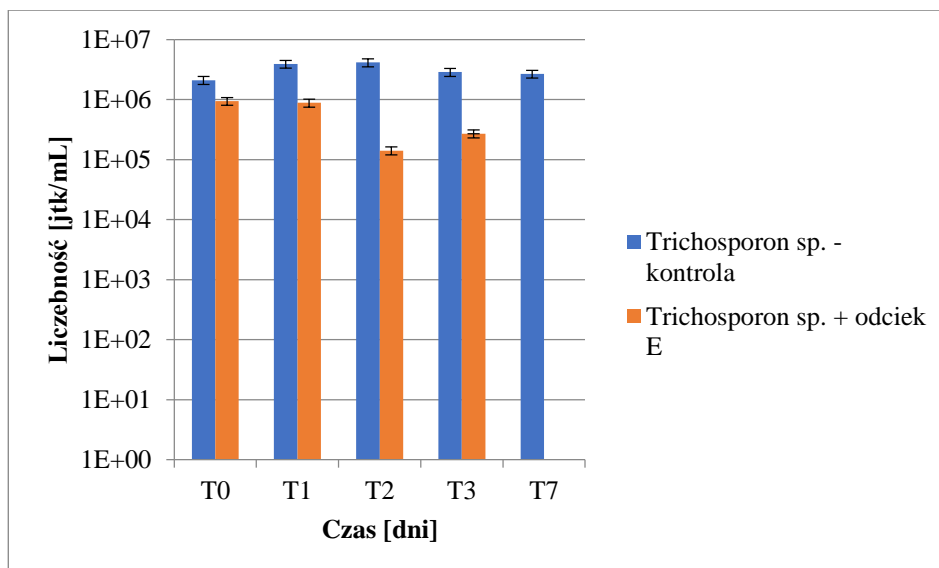
Ryc. 32. Dynamika populacji drożdży *Candida sp. D11* (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek E + drożdże)



Ryc. 33. Dynamika populacji drożdży *Hansenula polymorpha* (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek E + drożdże)



Ryc. 34. Dynamika populacji drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek E + drożdże)



Ryc. 35. Dynamika populacji drożdży *Trichosporon sp.* (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek E + drożdże)

Tabela 17. Ocena efektywności usuwania związków biogennych i zanieczyszczeń organicznych z odcieku E przez wybrane szczepy drożdży

Nazwa szczepu	Oznaczany parametr	Wartość – T0 ściek zwirowany [mg/L]	Wartość – T7 ściek po inkubacji [mg/L]
<i>Candida sp. D11</i>	ChZT	4040,00 ± 16,46 a	3945,00 ± 25,00 a
	NH ₄ ⁺ – N	3153,33 ± 55,08 a	2350,00 ± 50,00 b
	PO ₄ ³⁻ – P	51,40 ± 0,87 a	72,67 ± 5,03 b
<i>Hansenula Polymorpha</i>	ChZT	4040,00 ± 16,46 a	3620,00 ± 52,92 b
	NH ₄ ⁺ – N	3153,33 ± 55,08 a	2640 ± 140,00 b
	PO ₄ ³⁻ – P	51,40 ± 0,87 a	72,33 ± 7,02 b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ChZT	4040,00 ± 16,46 a	3300,00 ± 100,00 b
	NH ₄ ⁺ – N	3153,33 ± 55,08 a	2620,00 ± 10,00 b
	PO ₄ ³⁻ – P	51,40 ± 0,87 a	71,67 ± 5,77 b
<i>Trichosporon sp.</i>	ChZT	4040,00 ± 16,46 a	3492,67 ± 89,22 b
	NH ₄ ⁺ – N	3153,33 ± 55,08 a	2840,00 ± 87,18 b
	PO ₄ ³⁻ – P	51,40 ± 0,87 a	74,17 ± 3,69 b

Wyniki zawartości materii organicznej w odciekach po inkubacji z poszczególnymi izolatami drożdży w większości przypadków nie różniły się znacząco od odcieków nietraktowanych. Zawartość azotu amonowego uległa obniżeniu (tab. 14 – 17), jednakże wydajność jego usuwania należy uznać za niewystarczającą. Fosfor z kolei wykazywał

tendencję rosnącą, najprawdopodobniej na skutek wprowadzania dodatkowej puli fosforu wraz z zaszczeploną biomasą.

Podejście z wykorzystaniem potencjału mikroorganizmów autochtonicznych okazało się znacznie bardziej skuteczne, zwłaszcza pod względem eliminacji najbardziej uciążliwego zanieczyszczenia azotem amonowym niż w przypadku bioaugmentacji wybranymi szczepami drożdży.

4.2 Badania cieczy pofermentacyjnej pozyskanej z biogazowni rolniczej – instalacji biometanizacji gnojowicy świńskiej

W próbkach surowej cieczy pofermentacyjnej BSZ, pochodzącej z **biogazowni zlokalizowanej na Słowacji**, oznaczono zawartości zanieczyszczeń.

Tabela 18. Charakterystyka cieczy pofermentacyjnej powstałej podczas biometanizacji gnojowicy świńskiej (BSZ)

Parametr	ChZT [mg O ₂ /L]	NH ₄ ⁺ – N [mg/L]	PO ₄ ³⁻ – P [mg/L]	NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ – N [mg/l]
Odciek BSZ	9702 ± 101,13	2554 ± 284,00	34,5 ± 1,32	54,5 ± 4,04

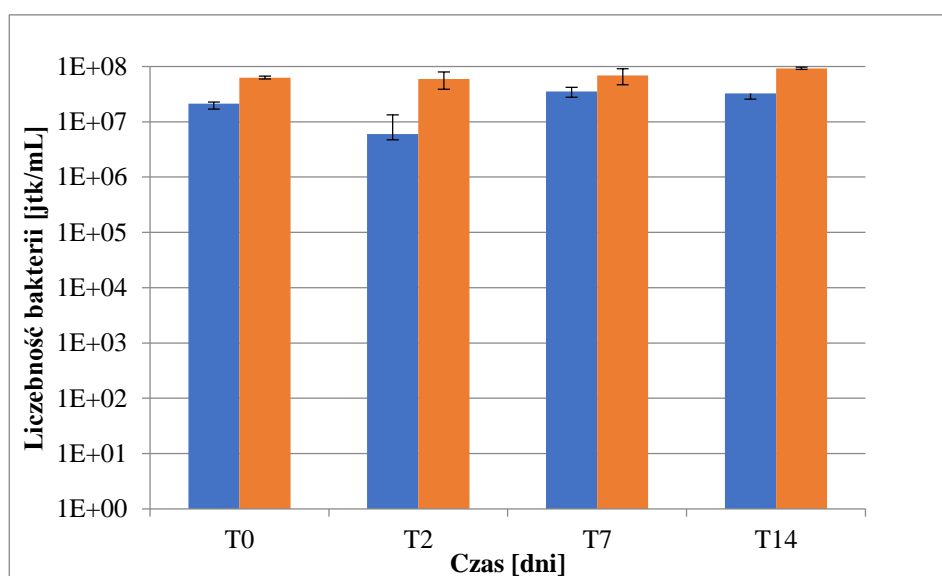
Oznaczona wartość ChZT, dla danego typu odcieku koreluje z zawartością OWO (ogólnego węgla organicznego) [Miksch i Sikora 2010], czyli z obecnością przyswajalnych związków węgla. Analiza ChZT w badanym odcieku wykazała, że w odcieku BSZ, mimo wysokiego poziomu NH₄⁺ – N, duży ładunek związków węgla objawiający się wartością ChZT bliską 10 000 mg/dm³ pozwalał wnioskować o dobrych warunkach do namnażania drobnoustrojów.

Badana ciecz charakteryzowała się zawartością azotu amonowego kilkudziesięciokrotnie przekraczającą obowiązujące normy (wartość progowa określona dla azotu ogólnego wynosi w ściekach 30 mg/L – zgodnie z rozporządzeniem [Rozporządzenie Ministra Gospodarki Morskiej i Żeglugi Śródlądowej 2019]). Równocześnie, stężenia azotu azotanowego (III) i (V) oraz fosforu ogólnego (P_{og.}) były niskie i jedynie w niewielkim stopniu przewyższały ustalone normy (wartość normatywna dla P_{og.} wynosi 10 mg/L [Rozporządzenie Ministra Gospodarki Morskiej i Żeglugi Śródlądowej 2019] (tab. 18). Zgodnie z danymi literaturowymi, wartości te nie są toksyczne dla środowiska oraz nie przekraczają poziomów uznawanych za optymalne dla wzrostu roślin uprawnych (55 – 100 mg/L dla N_{og.} i 60 – 80 mg/L dla P_{og.}) [Britto i Kronzucker 2002; Gerardi 2003].

Z przedstawionych powyżej powodów, w dalszych doświadczeniach nie prowadzono obserwacji stężenia fosforu i skupiono się na procesach zmierzających do spadku poziomu azotu amonowego, który stanowił główny czynnik uciążliwości środowiskowej oraz zagrożenie toksycznością wobec roślin [Britto i Kronzucker 2002]. Badano jednak nadal stężenie związków azotu azotanowego (III) i (V), aby wykluczyć bądź potwierdzić możliwość biotransformacji azotu amonowego na drodze nityfikacji.

Analiza mikrobiologiczna surowego odcieku BSZ wykazała obecność licznych i różnorodnych autochtonicznych bakterii ($2,14 \cdot 10^7$ jtk/mL), a jednocześnie nie stwierdzono występowania drożdży i innych grzybów mikroskopowych. Mikrobiota autochtoniczna składała się zarówno z Gram-ujemnych i Gram-dodatnich bakterii, które wytworzyły kilkanaście kolonii o odrębnych morfotypach na szalkach zawierających podłoże stałe (wyniki nieprezentowane). Duża liczebność oraz bioróżnorodność drobnoustrojów autochtonicznych korelowała z wysoką zawartością ChZT wyznaczoną dla próbki BSZ, co mogło być związane z obecnością łatwo przyswajalnego źródła węgla, sprzyjającego wzrostowi biomasy.

W testach bioremediacji, ze względu na wysoki ładunek azotu amonowego i materii organicznej, wydłużono czas inkubacji odcieku BSZ z autochtonami, do 14 dni. Jednocześnie badano drugi wariant eksperymentalny, który uwzględniał, oprócz wykorzystania mikroorganizmów autochtonicznych, bioaugmentację konsorcjum BLL (ryc. 36).



Ryc. 36. Dynamika populacji bakterii autochtonicznych (słupki niebieskie) i sumy bakterii po bioaugmentacji odcieku BSZ konsorcjum BLL (słupki pomarańczowe) podczas testu biooczyszczania

Tabela 19. Wyniki analiz poziomu chemicznego zapotrzebowania tlenu oraz zawartości azotu amonowego, azotu azotanowego i azotynowego podczas testu bioremediacji odcieku BSZ

	T0	T14	
Rodzaj biocenozy	odciek BSZ (surowy)	odciek BSZ po inkubacji z autochtonami	odciek BSZ po bioaugmentacji konsorcjum BLL
Parametry			
ChZT [mg O₂/L]	9702,00 ± 101,13 a	4752,50 ± 7,50 b	4562,00 ± 188,00 b
NH₄⁺ – N [mg/L]	2554,00 ± 284,00 a	1640,00 ± 74,64 b	293,75 ± 66,25 c
NO₂⁻/NO₃⁻ – N [mg/L]	54,67 ± 4,04 a	12,60 ± 0,53 b	12,37 ± 1,00 b

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń uzyskano znaczące spadki zawartości zanieczyszczeń. Bioaugmentacja konsorcjum BLL przyniosła pożądany efekt intensyfikacji oczyszczania cieczy – zawartość azotu obniżyła się 88,5% (tab. 19). Stopień redukcji tego biogenu w porównaniu z wariantem uwzględniającym jedynie drobnoustroje autochtoniczne (redukcja o 36%), jest znacząco wyższy. Azot nie został przy tym przekształcony w formy azotanowe, co świadczy o jego przyswojeniu przez mikroorganizmy w postaci biomasy.

Zawartość fosforu i poziom ChZT również uległy obniżeniu, w tym przypadku jednak nie było znaczących różnicy pomiędzy wariantami (spadek P_{og.} o 77% i spadek ChZT o ok. 50%) (tab. 19).

4.3 Badania odcieków powstających podczas fermentacji metanowej osadów ściekowych miejskich oczyszczalni ścieków

4.3.1 Ciecze pofermentacyjne po biometanizacji osadów ściekowych w Bielsku-Białej

4.3.1.1 Analizy fizykochemiczne odcieku

W próbkach cieczy pofermentacyjnej BB oznaczono poziom chemicznego zapotrzebowania tlenu (ChZT) oraz zawartości azotu amonowego (NH₄⁺ – N), azotu azotanowego (III i V, NO₂⁻/NO₃⁻ – N) i fosforanów (PO₄³⁻ – P). Wyniki oznaczeń przedstawiono w tabeli 20. Wartości poszczególnych parametrów wskazują na wysoki poziom zanieczyszczenia odcieku BB związkami biogennymi, w szczególności azotem amonowym, jak również świadczą o wyjątkowo niekorzystnym stosunku C:N, wynoszącym 0,45. Taki stan rzeczy może wpływać hamująco na proliferację mikroorganizmów.

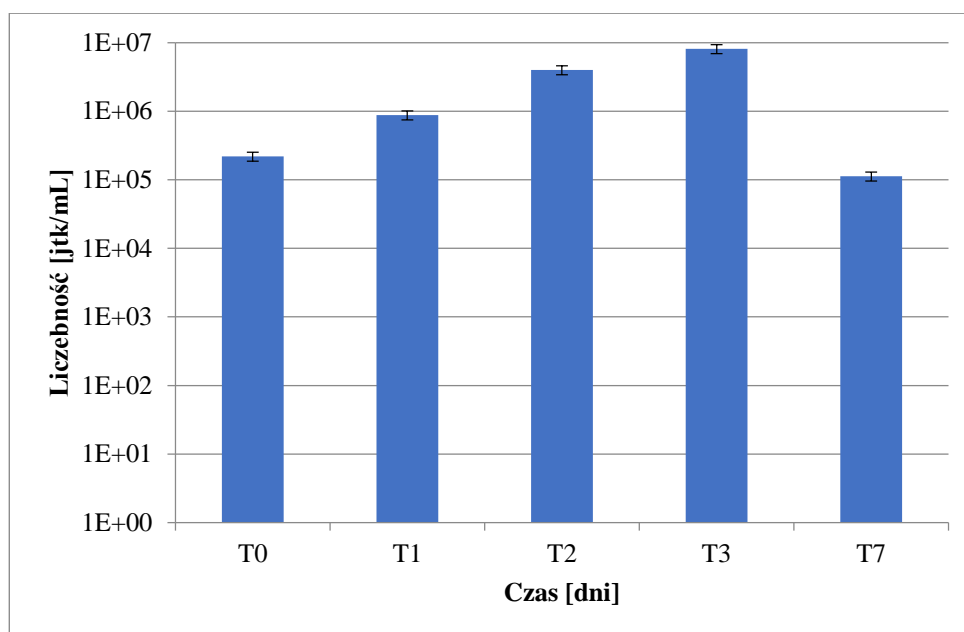
Tabela 20. Charakterystyka odcieku BB po fermentacji beztlenowej osadów ściekowych w Bielsku-Białej

Parametr	ChZT [mg O ₂ /L]	NH ₄ ⁺ – N [mg/L]	PO ₄ ³⁻ – P [mg/L]	NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ – N [mg/L]
Odciek BB	482,00 ± 7,21	1071 ± 16,70	7,16 ± 1,26	44,00 ± 4,58

Zgodnie z przewidywaniami, odciek BB był kolonizowany przez nieliczną mikrobiotę autochtoniczną, której liczebność oznaczono jako $2,1 \cdot 10^5$ jtk/mL.

4.3.1.2 Analizy i mikrobiologiczne i określenie potencjału mikrobioty autochtonicznej w usuwaniu zanieczyszczeń

Przeprowadzono 7-dniową inkubację odcieku BB w warunkach napowietrzania. Po zakończeniu doświadczenia, zwraca uwagę fakt, że 3-dniowa inkubacja odcieku w warunkach napowietrzania (ryc. 37) pozwoliła na niemal 100-krotny przyrost biomasy autochtonów, co jednak nieznacznie wpłynęło na zmianę zawartości zanieczyszczeń w odcieku (tab. 21). Tylko w przypadku azotu amonowego uzyskano spadek, ale wyniósł on jedynie 21%.



Ryc. 37. Dynamika populacji bakterii autochtonicznych podczas inkubacji odcieku BB w warunkach napowietrzania

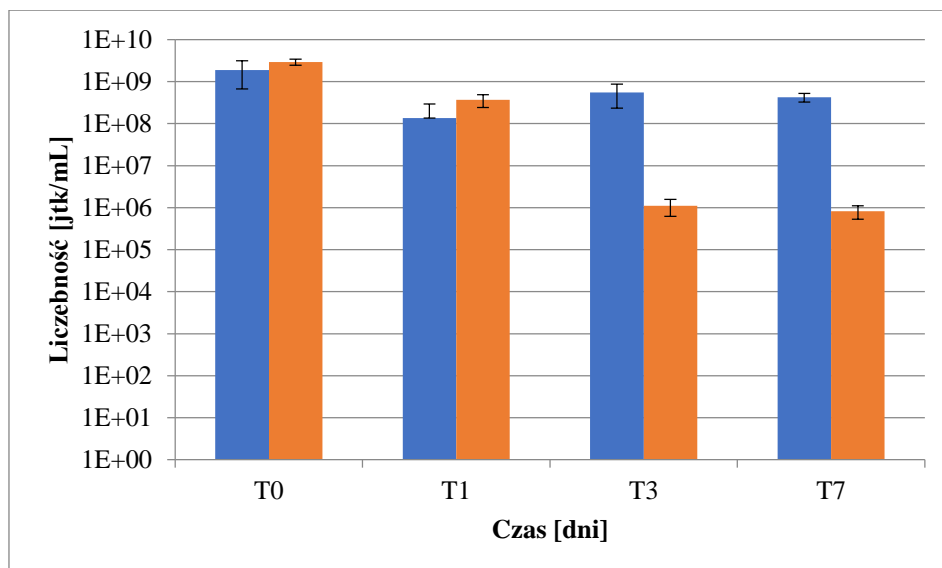
Tabela 21. Charakterystyka odcieku BB po fermentacji beztlenowej osadów ściekowych w Bielsku-Białej: wartości uzyskane dla ścieków surowych (jak w tab. 20) i poddanych 7-dniowej inkubacji z bakteriami autochtonicznymi

Parametr Odciek	ChZT [mg O₂/L]	NH₄⁺- N [mg/L]	PO₄³⁻ - P [mg/L]	NO₂⁻/NO₃⁻N [mg/L]
Surowy odciek BB	482,00 ± 7,21a	1071 ± 16,70 a	7,16 ± 1,26 a	44,00 ± 4,58 a
Odciek BB po inkubacji z bakteriami autochtonicznymi	538,00 ± 8,00 b	845,67 ± 9,81b	2,60 ± 0,53 b	45,33 ± 5,51 a

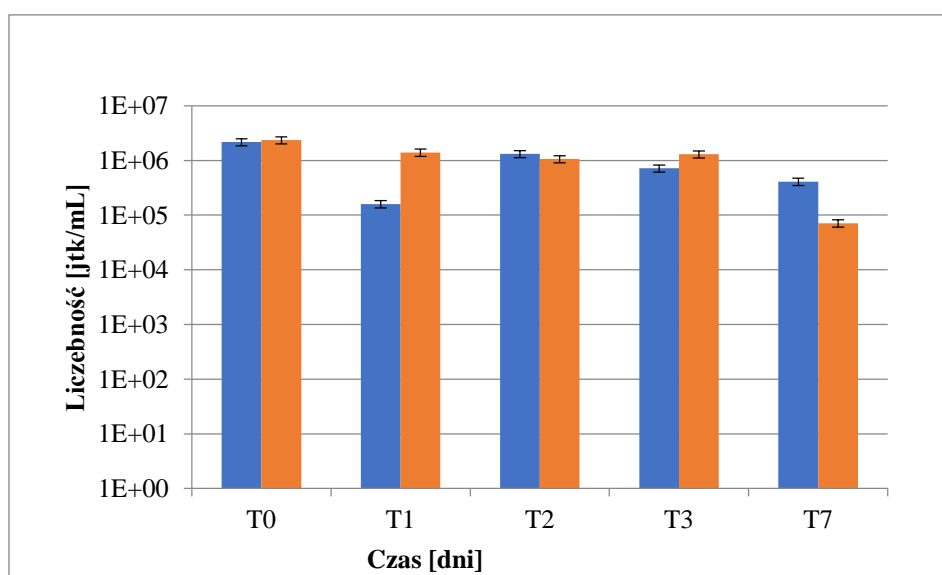
4.3.1.3 Badania toksyczności

W celu określenia toksyczności odcieków BB wykonano testy przeżywalności wybranych szczepów bakterii i drożdży oraz konsorcjów mikrobiologicznych. Dokonując wyboru drobnoustrojów kierowano się właściwościami poszczególnych mikroorganizmów, a zwłaszcza ich potencjałem aplikacyjnym w procesach oczyszczania ścieków. Ponadto, badano wpływ odcieku na bakterie zoogłeałne i drobnoustroje osadu czynnego pochodzącego z biologicznej oczyszczalni ścieków w Krzeszowicach.

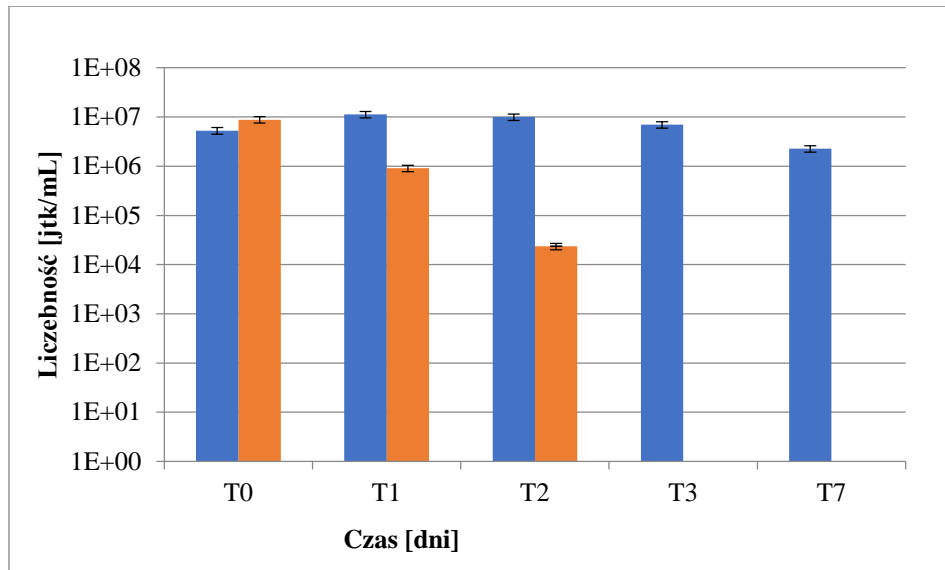
Badania przeprowadzono, kolejno, po zaszczepieniu próbek odcieku biomasą wyhodowanych następujących drobnoustrojów: monokultury *Pseudomonas* sp. 18, drożdży: *Candida* sp. D11, *Hansenula polymorpha*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Trichosporon* sp., konsorcjów: SB, ZB-01 oraz bakterii *Zoogloea ramigera* i osadu czynnego. Równolegle prowadzono obserwacje kontrolne hodowli inkubowanych w płynnych podłożach (YCU – drożdże, BH – bakterie, konsorcja i osad czynny). Wyniki analiz toksyczności przedstawiono na ryc. 38 – 46.



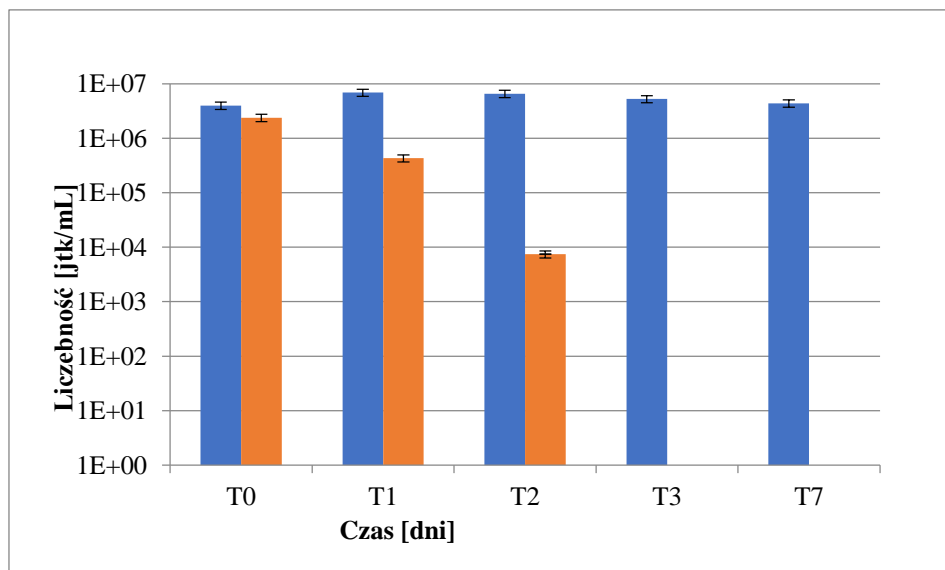
Ryc. 38. Dynamika populacji bakterii podczas inkubacji odcieku BB z bakteriami *Pseudomonas* sp. 18 (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek + bakterie)



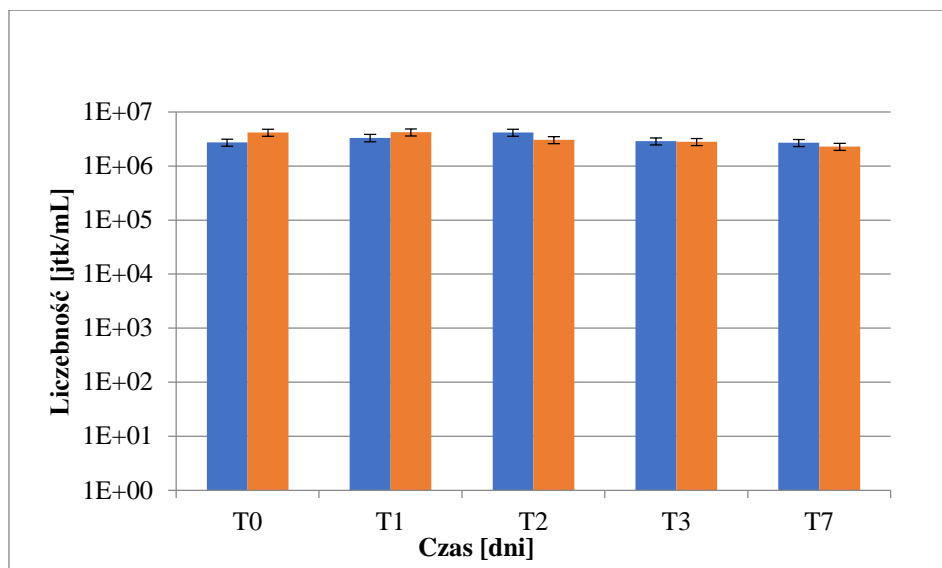
Ryc. 39. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieku BB z drożdżami *Candida* sp. D11 (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek + drożdże)



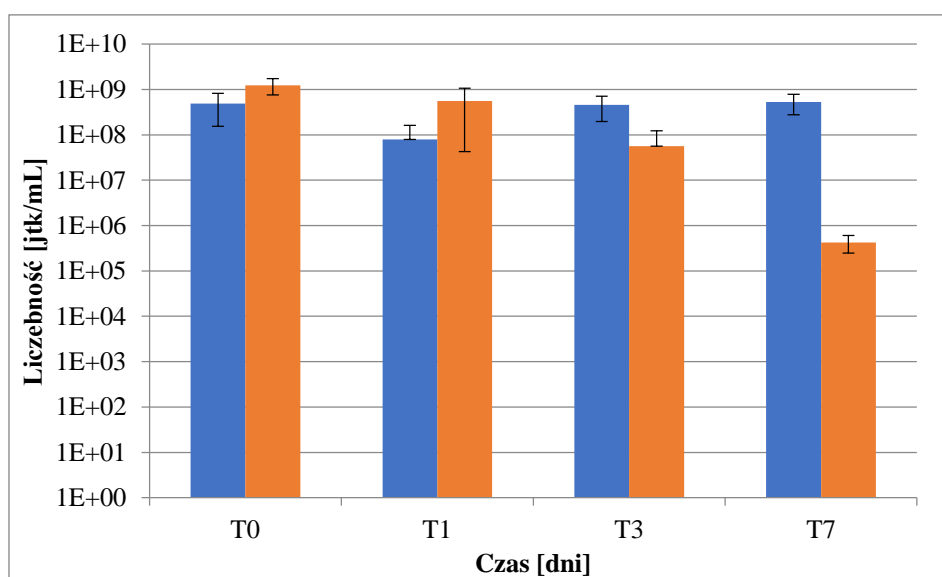
Ryc. 40. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieku BB z drożdżami *Hansenula polymorpha* (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + drożdże)



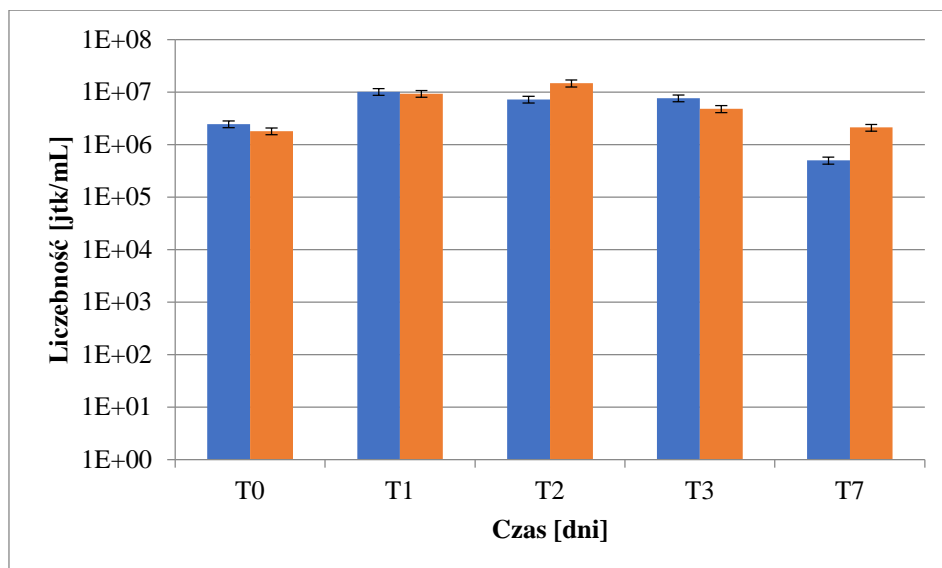
Ryc. 41. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieku BB z drożdżami *Saccharomyces cerevisiae* (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + drożdże)



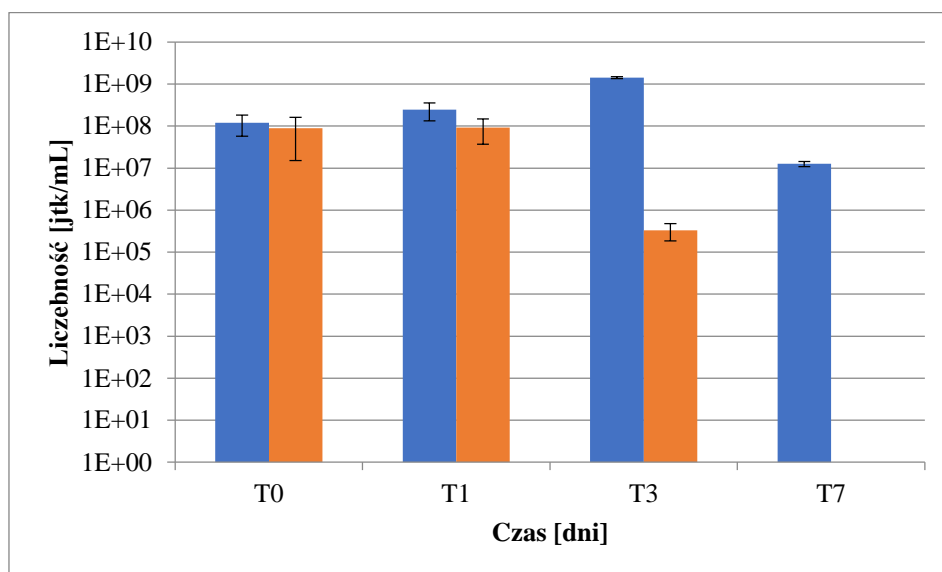
Ryc. 42. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieku BB z drożdżami *Trichosporon* sp. (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + drożdże)



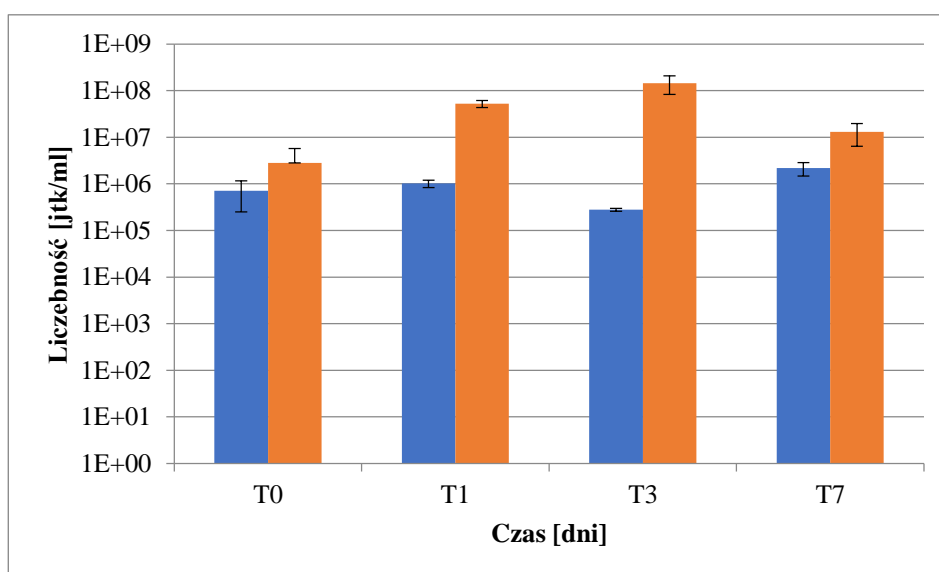
Ryc. 43. Dynamika populacji bakterii podczas inkubacji odcieku BB z konsorcjum SB: *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Rhizobium radiobacter* (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + konsorcjum)



Ryc. 44. Dynamika populacji bakterii podczas inkubacji odcieku BB z biopreparatem ZB-01 (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek + konsorcjum)



Ryc. 45. Dynamika populacji bakterii podczas inkubacji odcieku BB z bakteriami *Zoogloea ramigera* DSMZ (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek + bakterie)



Ryc. 46. Dynamika populacji bakterii osadu czynnego podczas inkubacji odcieku BB z osadem czynnym pochodzącym z oczyszczalni ścieków w Krzeszowicach (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek + osad czynny)

Testy toksyczności wykazały, że odciek BB może być zagrożeniem dla środowiskowych bakterii, drożdży i osadu czynnego. Szczególnie wysoką toksyczość wykazano względem szczepu bakteryjnego *Pseudomonas* sp. 18, bakterii zoogloalnych *Zoogloea ramigera*, jak również konsorcjum bakterii glebowych SB (*Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Rhizobium radiobacter*) oraz drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i *Hansenula polymorpha*. Liczebność bakterii obecnych w osadzie czynnym uległa wzrostowi, co świadczy o rozpadzie struktury kłaczków osadu czynnego i jest zjawiskiem negatywnym. Badane pozostałe parametry tj. morfologia i indeks osadowy, również świadczą o złej kondycji osadu czynnego (ryc. 52, tab. 24, Patrz pkt. 4.3.1.4). Na zdjęciach mikroskopowych zaobserwowano zdefragmentowane kłaczkosy osadu czynnego, z kolei wartość indeksu osadowego wyniosła 67 mL/g s.m., przy czym osad czynny dobrze pracujący ma indeks w granicach 80-120 mL/g s.m.

Brak efektu toksycznego stwierdzono w przypadku konsorcjum ZB-01 oraz izolatów środowiskowych drożdży niekonwencjonalnych *Trichosporon* sp. i *Candida* sp. D11. Potencjał tych drobnoustrojów wykorzystano w oczyszczaniu odcieku BB w kolejnym etapie prac (Patrz pkt. 4.3.1.4).

4.3.1.4 Oczyszczanie odcieku BB przy użyciu drożdży oraz konsorcjów bakteryjnych i bakteryjno-drożdżowych

Odciek BB, który cechuje się stosunkowo ubogą mikrobiotą autochtoniczną oraz niesprzyjającymi warunkami rozwoju populacji bakteryjnej, bioaugmentowano konsorcjum bakteryjnym – biopreparatem ZB-01 (wariant BB-I), a w kolejnych wariantach zintegrowanymi konsorcjami bakteryjno-drożdżowymi, które uzyskano poprzez zmieszanie w stosunku 1:1 (v/v) zawiesin hodowli konsorcjum ZB-01 i *Candida* sp. D11 (wariant BB-II) lub hodowli konsorcjum ZB-01 i szczepu *Trichosporon* sp. (wariant BB-III). Obserwacje bioremediacji cieczy prowadzono przez 7 dni wobec kontroli, którą był odciek niezaszczepiony. W trakcie eksperymentu kontrolnego stwierdzono stosunkowo niewielką zdolność odcieku do samooczyszczenia (tab. 22). Jakkolwiek zaobserwowano tendencję wzrostową w liczebności bakterii autochtonicznych (od początkowej wartości $2,1 \cdot 10^5$ jtk/mL do liczebności wynoszącej w trzeciej dobie prowadzenia eksperymentu $9,1 \cdot 10^6$ jtk/mL), przyrost ten można uznać za nieznaczący biorąc pod uwagę skuteczność oczyszczania ścieku (tab. 22). Obniżenie zawartości azotu amonowego wynosiło jedynie 21,4%, co było spowodowane niewystarczającą aktywnością stosunkowo nielicznej populacji autochtonów.

W testowanych wariantach mikrobiologicznego oczyszczania ścieku bioaugmentowanego, drobnoustroje, które zostały zaszczerpione, były zdolne do przetrwania przez cały okres trwania eksperymentu, tj. 7 dni (ryc. 47 i 48).

W wariacie BB-I uzyskano najlepsze wyniki bioremediacji (tab. 22). W przypadku tym stwierdzono usunięcie 46% początkowej zawartości azotu amonowego. Zawartość azotu azotanowego (III i V) także zmalała po 7 dniach o ponad 45%, co sugeruje, że usuwanie azotu amonowego odbywało się w skutek wiązania N przez biomasę (wbudowywania w struktury komórkowe), nie zaś w procesie nityfikacji. Bezpośrednio po zaszczerpieniu biocenozą ZB-01, oznaczono liczebność drobnoustrojów w odcieku. Liczebność bakterii wyniosła $2,75 \cdot 10^6$ jtk/mL (ryc. 47), czyli o rząd wielkości niż liczebność bakterii autochtonicznych. Populacja zaszczerpionych bakterii wzrosła w początkowej fazie obserwacji do $8,16 \cdot 10^6$ jtk/mL, aby na koniec testu (dzień T7 ryc. 47) nieco obniżyć się do $5,73 \cdot 10^6$ jtk/mL.

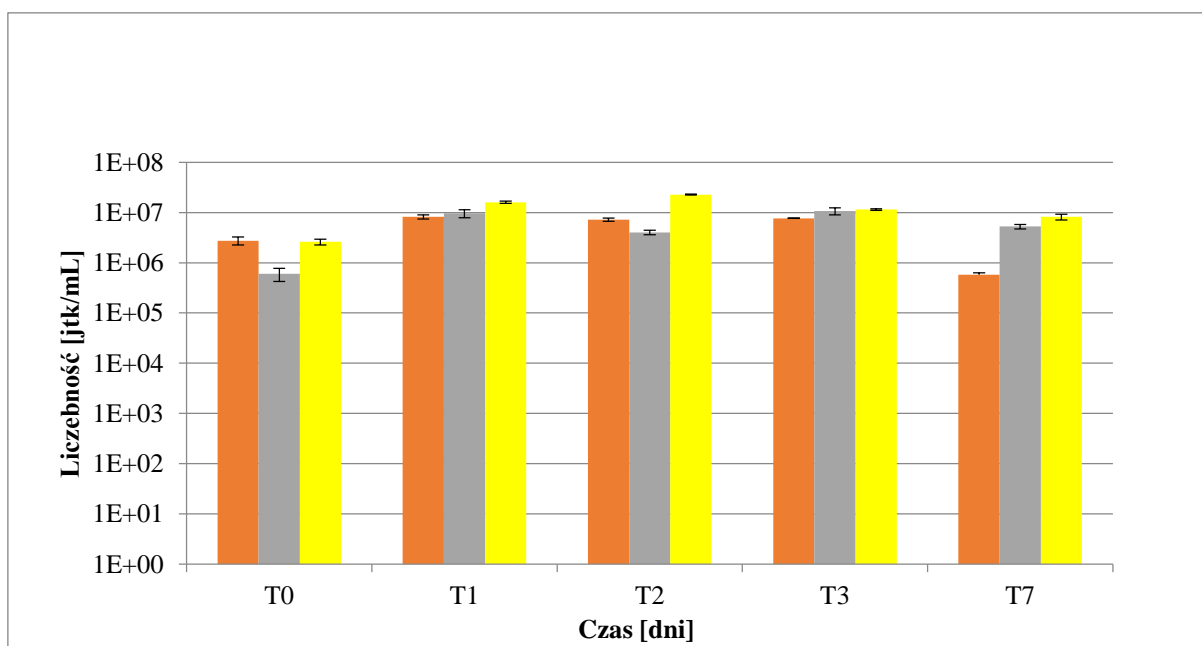
Warianty BB-II i BB-III obejmowały ocenę skuteczności procesu oczyszczania przy użyciu konsorcjum zawierającego biopreparat ZB-1 i drożdże (tab. 22). Zastosowanie szczepu *Candida* sp. D11 pozwoliło uzyskać zaledwie 14 procentową wydajność usuwania azotu amonowego. Było to wynikiem gorszym od wariantu kontrolnego, co sugeruje wręcz zahamowanie procesu deamonifikacji. Z kolei, obecność drożdży *Trichosporon* sp. umożliwiła uzyskanie 37-procentowej wydajności, jednak wynik ten wciąż nie był satysfakcjonujący w porównaniu z wariantem BB-I.

Dodatek szczepów drożdżowy nie wywołał oczekiwanego rezultatu w postaci synergii pomiędzy mikroorganizmami znajdującymi się w powstałym konsorcjum mieszanym.

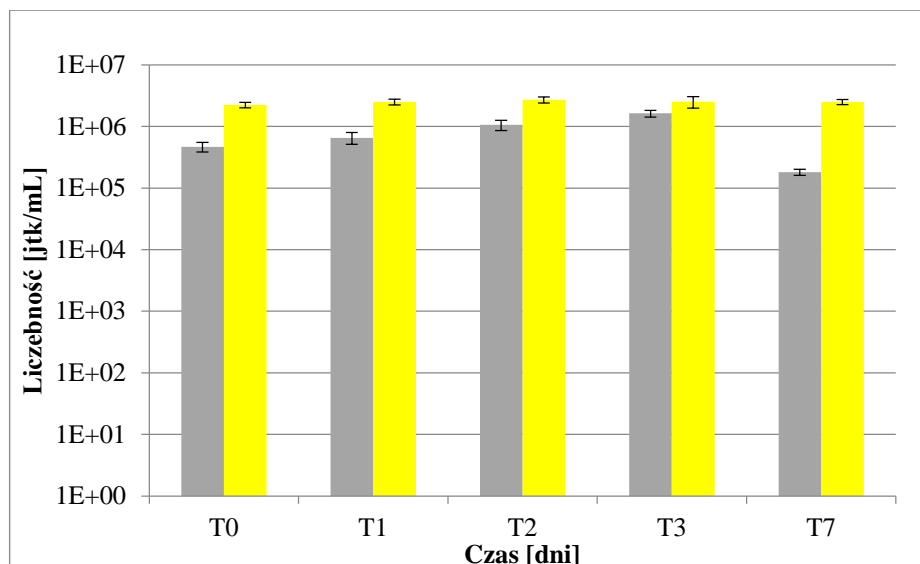
Konsorcjum bakteryjne ZB-01 okazało się najbardziej skuteczne. Podczas analizy statystycznej wykazano, że oznaczone zawartości N amonowego były we wszystkich badanych przypadkach statystycznie istotnie różne w odniesieniu do wartości jakie uzyskano dla odcieku surowego. Warianty BB-I i BB-III natomiast nie różniły się istotnie między sobą.

Obecność komponenty drożdżowej (w wariacie BB-II i BB-III) wpłynęła na znaczące zwiększenie (o rząd wielkości) przeżywalności konsorcjum bakteryjnego w odniesieniu do odcieku, który został zaszczipiony wyłącznie bakteriami (wariant BB-I) (ryc. 47). Gęstość biomasy bakteryjnej w odcieku BB, po 7 dniach inkubacji po zaszczipieniu wynosiła, dla wariantów BB-I, BB-II i BB-III, kolejno: $5,73 \cdot 10^5$, $5,27 \cdot 10^6$ i $8,19 \cdot 10^6$ jtk/mL.

Poziom ChZT podczas traktowania cieczy pofermentacyjnej nie zmieniał się (warianty BB-I i BB-III) bądź wręcz wzrastał (wariant BB-II). W związku z niską początkową wartością ChZT, która wskazuje na niewielką ilość OWO, zaobserwowane dane są najprawdopodobniej skutkiem powiększenia frakcji OWO, co nastąpiło wskutek wprowadzenia biomasy inokulatów o dużej gęstości – podania dodatkowej frakcji organicznej po zaszczipieniu (tab. 22).



Ryc. 47. Dynamika populacji bakterii podczas inkubacji odcieku BB zaszczipionego biocenozą ZB-01 (słupki pomarańczowe), biocenozą ZB-01 + *Candida* sp. D11 (słupki szare), oraz biocenozą ZB-01 + *Trichosporon* sp. (słupki żółte)



Ryc. 48. Zmiany liczebności drożdży *Candida sp. D11* (słupki szare) i *Trichosporon sp.* (słupki żółte) podczas inkubacji w odcieku BB zaszczeponym biocenozą ZB-01

Tabela 22. Charakterystyka odcieku BB poddanego wariantowym procesom mikrobiologicznego oczyszczania

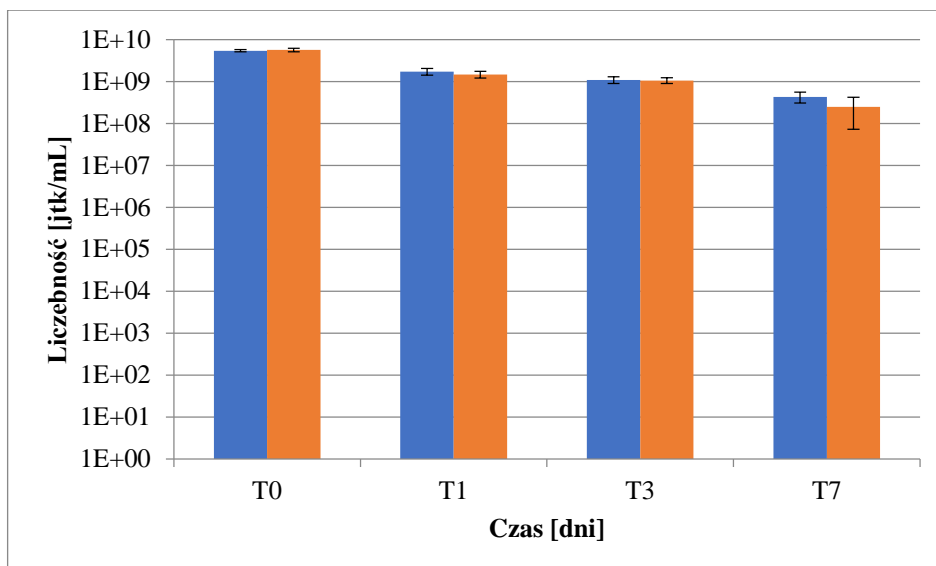
Parametr	ChZT [mg O ₂ /L]	NH ₄ ⁺ - N [mg/L]
Odciek		
odciek BB (surowy)	482,00 ± 7,21 a	1071,00 ± 16,70 a
odciek po inkubacji z drożdżami <i>Candida sp. D11</i>	963 ± 57,00 c	810 ± 34,00 b
odciek po inkubacji z drożdżami <i>Trichosporon sp.</i>	914 ± 98,00 c	840 ± 43,00 b
odciek BB (kontrola – obecność bakterii autochtonicznych)	537,33 ± 3,06 b	847,67 ± 29,26 b
Wariant BB-I (Odciek BB po inkubacji z ZB-01)	532,00 ± 26,00 a	581,00 ± 12,00 c
Wariant BB-II (Odciek BB po inkubacji z ZB-01 + <i>Candida sp. D11</i>)	1014,00 ± 119,00 c	922,00 ± 61,00 b
Wariant BB-III (Odciek BB po inkubacji z ZB-01 + <i>Trichosporon sp.</i>)	590,00 ± 36,00 a	673,00 ± 53,00 c

4.3.1.5 Dwuetapowe podejście oczyszczania i detoksykacji odcieku i osadem czynnym

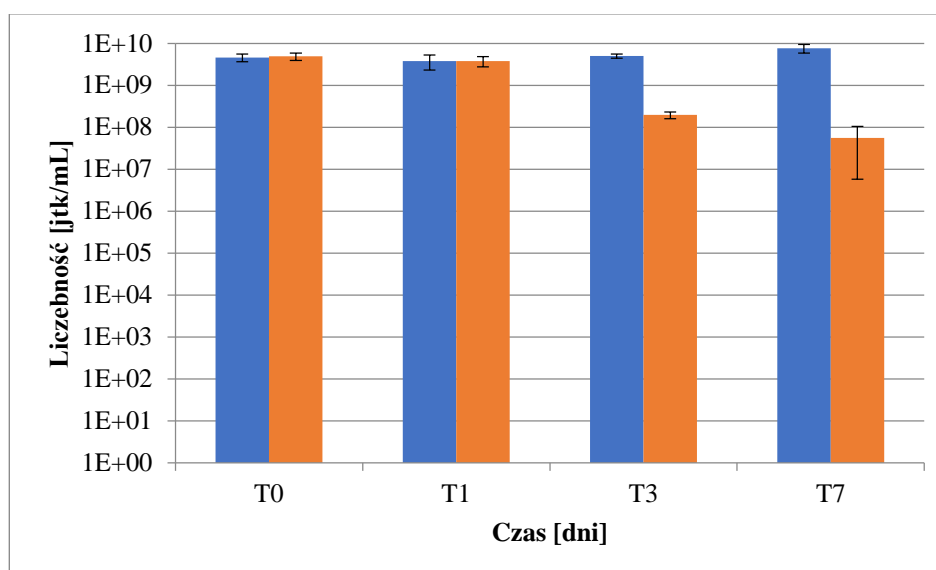
Wobec stwierdzonej wysokiej toksyczności odcieku BB podjęto działania w celu eliminacji zagrożeń wynikających z wprowadzenia odcieku do systemu oczyszczalni ścieków. Zaproponowana koncepcja oczyszczania dwuetapowego obejmowała wykorzystanie mikroskopowych fotosyntetyzujących glonów (konsorcjum ZTT i *Chlorella sorokiniana*), a następnie zbadanie możliwości i skuteczności bioremediacji z wykorzystaniem osadu czynnego biologicznej oczyszczalni ścieków.

W Odcieku BB, w etapie pierwszym, po 14-dniowym traktowaniu mikroalgami zaobserwowano jedynie nieznaczne zmiany parametrów (tab. 23). O ile poziom azotu (wszystkich badanych form) uległ obniżeniu, zawartość fosforu wzrosła znacząco. Największa zmiana zaszła jednak w poziomie toksyczności względem bakterii allochotnicznych i osadu czynnego (ryc. 49 – 54). Odciek poddany działaniu konsorcjum mikroalg nie wpływał negatywnie na liczebność *Zoogloea ramigera* i *Pseudomonas* sp. 18 oraz jedynie nieznacznie obniżał liczebność konsorcjum bakterii glebowych SB (*Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Rhizobium radiobacter*) w ostatniej fazie eksperymentu (T7). Te korzystne wyniki znacząco różnią się od uzyskanych wcześniej podczas doświadczeń z surowym odciekiem BB (ryc. 38-46).

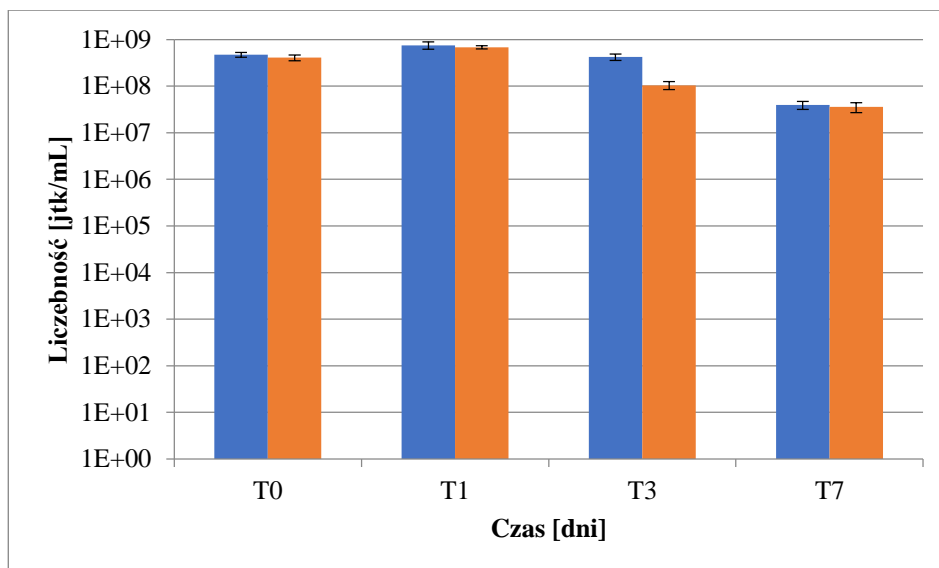
Badania kondycji osadu czynnego, na które składały się analizy mikroskopowe kłaczek, określanie indeksu osadowego Mohlmana oraz oznaczanie liczebności bakterii wolnopływających pozwoliły stwierdzić, iż surowy odciek BB był wysoce toksyczny względem osadu czynnego. Natomiast, odciek ten, po wcześniejszym traktowaniu mikroalgami okazał się nietoksyczny, a parametry osadu czynnego nie odbiegały od tych, jakie uzyskano dla próby kontrolnej (tab. 23, ryc. 52 – 55). Liczba bakterii w nadsączu (bakterie wolnopływające, niezintegrowane ze strukturą kłaczek) po inkubacji z surowym odciekiem B wynosiła $2,17 \cdot 10^6$ jtk/mL (ryc. 46), natomiast po traktowaniu algami spadła do wartości $4 \cdot 10^4$ jtk/mL (ryc. 52), co oznacza, że struktura osadu czynnego nie ulegała degradacji. Jednocześnie zaobserwowano polepszenie struktury kłaczek osadu czynnego (ryc. 53 – 55).



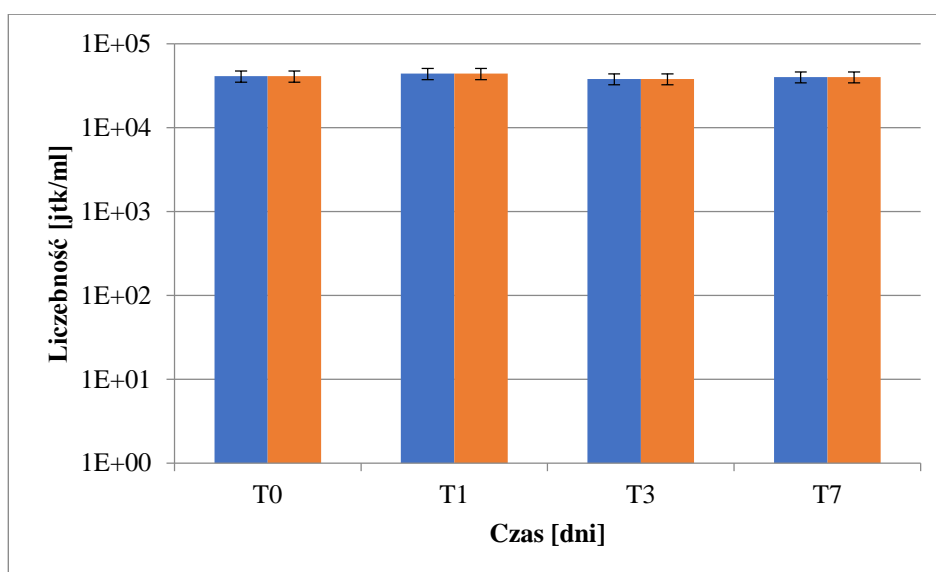
Ryc. 49. Dynamika populacji bakterii *Pseudomonas* sp. 18 podczas inkubacji w odcieku BB wstępnie oczyszczanym za pomocą konsorcjum mikroalg ZZT i szczepu *Chlorella sorokiniana* (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + bakterie)



Ryc. 50. Dynamika populacji bakterii konsorcjum SB (*Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Rhizobium radiobacter*) podczas inkubacji w odcieku BB wstępnie oczyszczanym za pomocą konsorcjum mikroalg ZZT i szczepu *Chlorella sorokiniana* (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + konsorcjum)



Ryc. 51. Dynamika populacji bakterii *Zoogloea ramigera* podczas inkubacji w odcieku BB wstępnie oczyszczanym za pomocą konsorcjum mikroalg ZYT i szczepu *Chlorella sorokiniana* (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + bakterie)



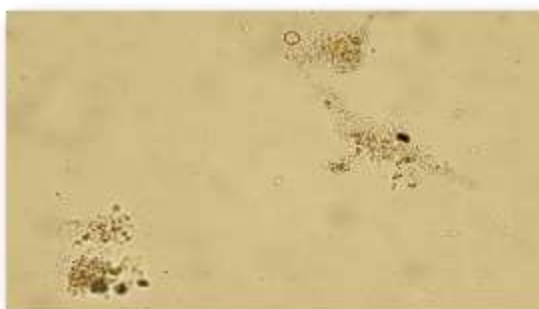
Ryc. 52. Dynamika populacji bakterii osadu czynnego podczas inkubacji w odcieku BB wstępnie oczyszczanym za pomocą konsorcjum mikroalg ZYT i szczepu *Chlorella sorokiniana* (słupki niebieskie – kontrola, pomarańczowe – odciek + osad czynny)

Tabela 23. Wartość indeksu osadowego Mohlmana w inkubowanej próbce osadu czynnego (kontrola), w próbce po 7-dniowej inkubacji z odciekiem BB oraz w próbce po 7-dniowej inkubacji z odciekiem BB wstępnie oczyszczonym za pomocą konsorcjum mikroalg ZTT i szczepu *Chlorella sorokiniana*

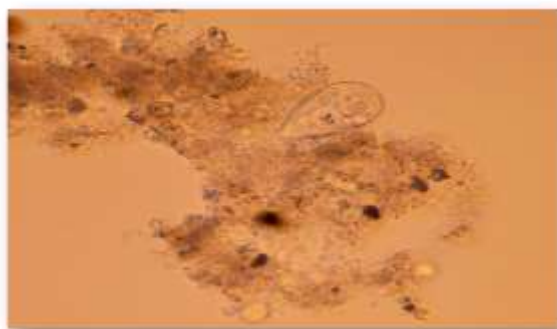
Wariant:	Indeks osadowy Mohlmana [mL/g s.m.]:
osad czynny – kontrola	89,33 ± 1,53
osad czynny po inkubacji z odciekiem BB	67,16 ± 1,23
osad czynny po inkubacji z wstępnie oczyszczonym (konsorcjum ZTT + <i>Chlorella sorokiniana</i>) odciekiem BB	85 ± 2,65



Ryc. 53. Obraz mikroskopowy przedstawiający kłaczkę osadu czynnego po 7 dniach inkubacji kontrolnej w warunkach napowietrzania, pow. 400x



Ryc. 54. Obraz mikroskopowy przedstawiający kłaczkę osadu czynnego po 7 dniach inkubacji z odciekiem BB w warunkach napowietrzania, pow. 400x



Ryc. 55. Obraz mikroskopowy przedstawiający osad czynny po 7 dniach inkubacji z odciekem BB wstępnie oczyszczanym za pomocą konsorcjum mikroalg ZTT i szczepu *Chlorella sorokiniana*) w warunkach napowietrzania, pow. 400x

Obiecujące wyniki testów toksyczności pozwalają na rozważenie tej metody jako alternatywy do oczyszczania, które okazało się często niewystarczająco skuteczne (Patrz pkt. 4.3.1.2 – 4.3.1.4). Tak zneutralizowany odciek, który jest całkowicie bezpieczny dla osadu czynnego może być kierowany do oczyszczalni ścieków i tam poddawany oczyszczaniu.

W drugim etapie oczyszczania odcieku BB, prowadzonym w obecności osadu czynnego, uzyskano bardzo dobre wyniki bioremediacji (tab. 24): analizy ChZT oraz zawartości azotu i fosforu wykazały znaczne obniżenie wartości tych parametrów po inkubacji z osadem czynnym. Poziom azotu amonowego spadł o 70,5%, poziom $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ – N o 37,3% a poziom ChZT o 38% w stosunku do odcieku surowego. Zwiększeniu uległ jedynie poziom fosforu, ale jego wartość nie przekraczała znacząco przyjętych norm.

Tabela 24. Charakterystyka odcieku BB poddanego procesowi dwuetapowego oczyszczania z zastosowaniem konsorcjum mikroalg oraz inkubacji z osadem czynnym

Parametr \ Odciek	ChZT [mg O ₂ /L]	NH ₄ ⁺ – N [mg/L]	PO ₄ ³⁻ – P [mg/L]	NO ₃ ⁻ /NO ₂ ⁻ – N [mg/L]
Odciek BB surowy	482,00 ± 7,21 ^a	1071 ± 16,70 ^a	7,16 ± 1,26 ^a	44,00 ± 4,58 ^a
Odciek BB wstępnie oczyszczany mikroalgami	214,00 ± 6,00 ^b	1042,3 ± 4,93 ^a	25,93 ± 0,95 ^b	8,77 ± 1,00 ^b
Odciek BB wstępnie oczyszczony za pomocą konsorcjum ZTT i szczepu <i>Chlorella sorokiniana</i> po traktowaniu osadem czynnym	172,33 ± 4,16 ^c	360,67 ± 7,02 ^b	32,50 ± 2,29 ^b	14,50 ± 1,32 ^c

4.3.2 Ciecze pofermentacyjne po biometanizacji osadów ściekowych w Krzeszowicach

4.3.2.1 Analizy fizykochemiczne

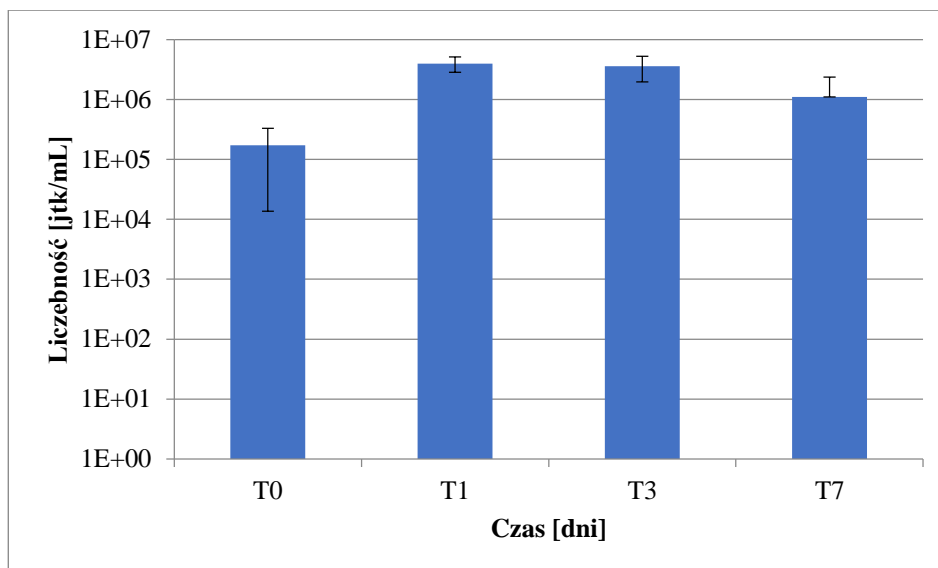
W próbce cieczy pofermentacyjnej po biometanizacji osadów ściekowych w Krzeszowicach (KK) oznaczono poziom chemicznego zapotrzebowania tlenu (ChZT) oraz zawartości azotu amonowego ($\text{NH}_4^+ - \text{N}$), azotu azotanowego (III i V, $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^- - \text{N}$) i fosforu ($\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$). Odciek charakteryzował się wysoką zawartością azotu amonowego, przekraczającą 30-krotnie normę określoną przepisami. Podobnie jak w przypadku odcieku BB, w odcieku KK oprócz wysokiego stężenia azotu, głównie amonowego stosunek C:N był zaburzony i w tym wypadku wynosił 0,4 (tab. 25). Odciek charakteryzował się również poziomem fosforu przekraczającym kilkakrotnie określone normy, jednakże przekroczenie to nie było tak wysokie jak w przypadku azotu.

Tabela 25. Charakterystyka odcieku KK po fermentacji beztlenowej osadów ściekowych w Krzeszowicach

Parametr	ChZT [mg O ₂ /L]	NH ₄ ⁺ – N [mg/L]	PO ₄ ³⁻ – P [mg/L]	NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ – N [mg/L]
Odciek KK	389,67 ± 2,52	986 ± 10,14	84,33 ± 3,79	23,33 ± 2,52

4.3.2.2 Określenie potencjału mikroflory autochtonicznej w usuwaniu zanieczyszczeń

W celu określenia potencjału drobnoustrojów autochtonicznych w oczyszczaniu odcieku KK przeprowadzono, podobnie jak dla poprzednich odcieków, jego inkubację w warunkach napowietrzania przez okres 7 dni. W wyniku przeprowadzonego doświadczenia zaobserwowano dziesięciokrotny wzrost liczebności drobnoustrojów z wartości $1,72 \cdot 10^5$ jtk/mL do $1,10 \cdot 10^6$ jtk/mL (ryc. 56). Obniżeniu uległa zawartość azotu amonowego (spadek o 37%) oraz poziom fosforu (spadek o 52%). Poziom ChZT i azotu azotanowego nie uległ znaczącemu obniżeniu (tab. 26).



Ryc. 56. Dynamika populacji bakterii autochtonicznych podczas inkubacji odcieku KK w warunkach napowietrzania

Tabela 26. Charakterystyka odcieku KK po fermentacji beztlenowej osadów ściekowych w Krzeszowicach: wartości uzyskane dla ścieków surowych (jak w tab. 25) i poddanych 7-dniowej inkubacji z bakteriami autochtonicznymi

Parametr Odciek	ChZT [mg O ₂ /L]	NH ₄ ⁺ - N [mg/L]	PO ₄ ³⁻ - P [mg/L]	NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ N [mg/L]
Surowy odciek KK	389,67 ± 2,52 a	986,00 ± 10,14 a	84,33 ± 3,79 a	23,33 ± 2,52 a
Odciek KK po inkubacji z bakteriami autochtonicznymi	378,50 ± 9,89 a	620,00 ± 14,75 b	40,50 ± 12,46 b	18,25 ± 5,00 a

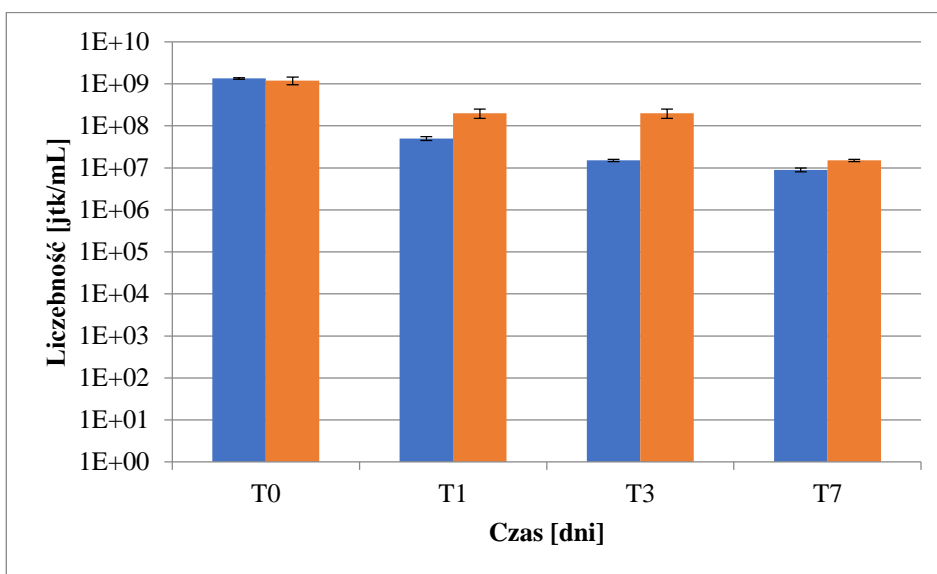
4.3.2.3 Analizy toksyczności

Dla odcieku KK wykonano testy przeżywalności wybranych szczepów bakterii i drożdży oraz konsorcjów mikrobiologicznych, których wyniki pozwalają na ustalenie możliwości zastosowania poszczególnych drobnoustrojów w dalszych etapach zagospodarowania odcieku.

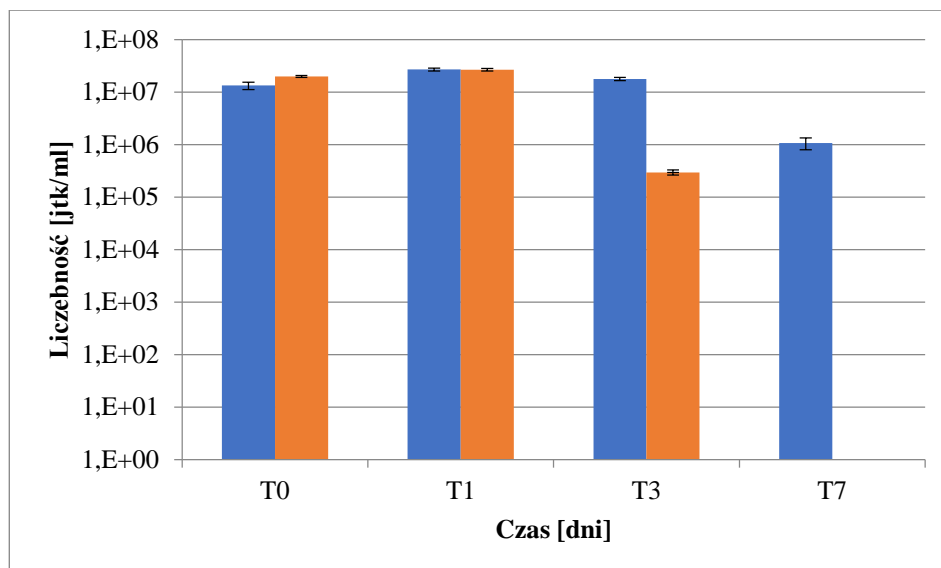
Przy planowaniu doświadczeń postępowano tożsamo jak w przypadku odcieku BB, zatem do badań wykorzystano drobnoustroje w niemal takim samym składzie, a zatem użyto: monokulturę *Pseudomonas* sp. 18, drożdże: *Candida* sp. D11, *Hansenula polymorpha*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Trichosporon* sp., *Yarrowia lipolytica*, konsorcja: SB, ZB-01 oraz bakterie: *Zoogloea ramigera* i osad czynny. W doświadczeniach z odciekiem KK (w

odróżnieniu od odcieku BB), przetestowano dodatkowo szczep drożdży *Yarrowia lipolytica*, gdyż istnieją liczne doniesienia na temat zdolności tych drożdży do usuwania różnego rodzaju zanieczyszczeń [Rao i in. 2013; Zinjarde i in. 2014; Mupa i in. 2018]. Kontrole stanowiły hodowle inkubowane w płynnych podłożach (YCU – drożdże, BH – bakterie, konsorcja oraz osad czynny). Wyniki analiz toksyczności przedstawiono na ryc. 57 – 66.

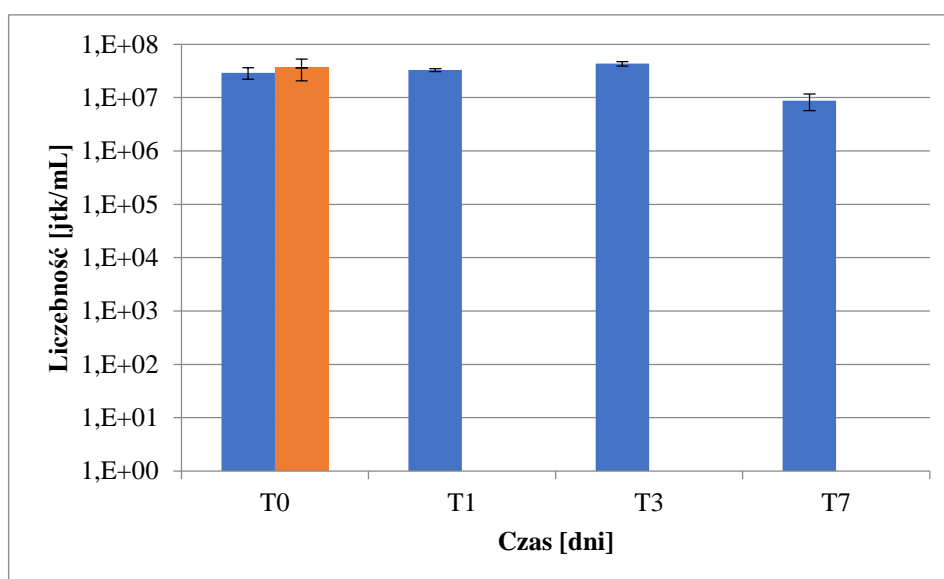
Dla osadu czynnego, oprócz liczebności bakterii wolnopływających, wykonano również mikroskopową analizę morfologiczną oraz określono indeks Mohlmana (ryc. 67 – 68, tab. 27).



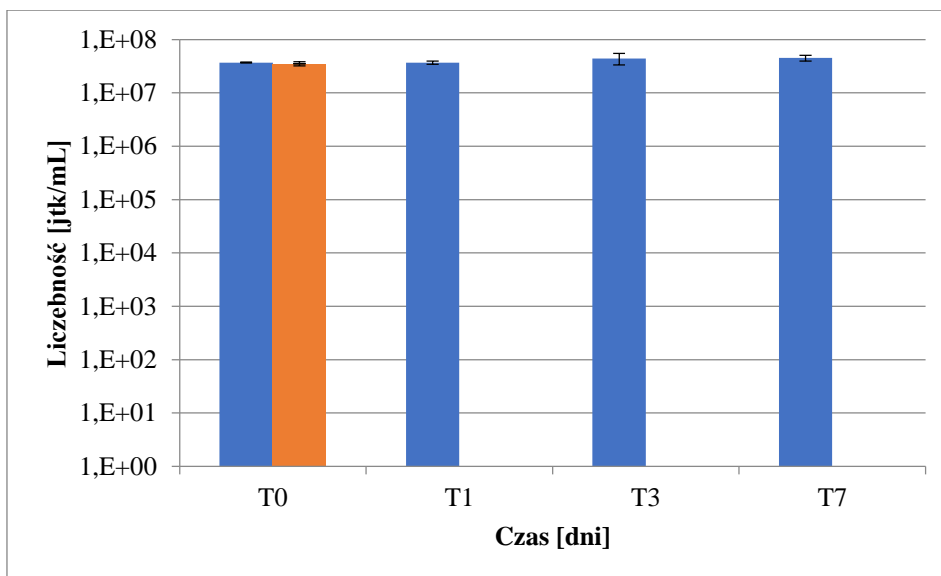
Ryc. 57. Dynamika populacji bakterii podczas inkubacji odcieku KK z bakteriami *Pseudomonas* sp. 18 (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + bakterie)



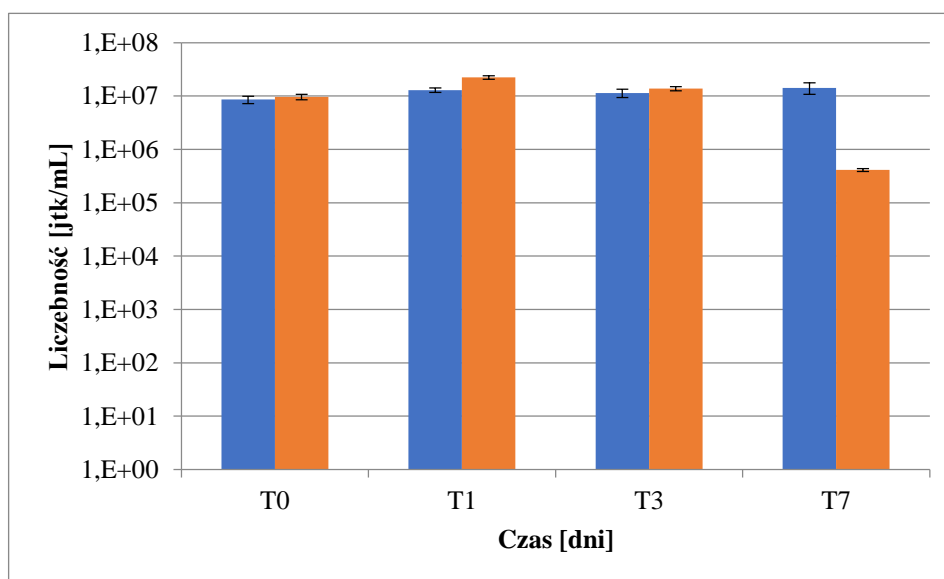
Ryc. 58. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieku KK z drożdżami *Candida* sp. D11 (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + drożdże)



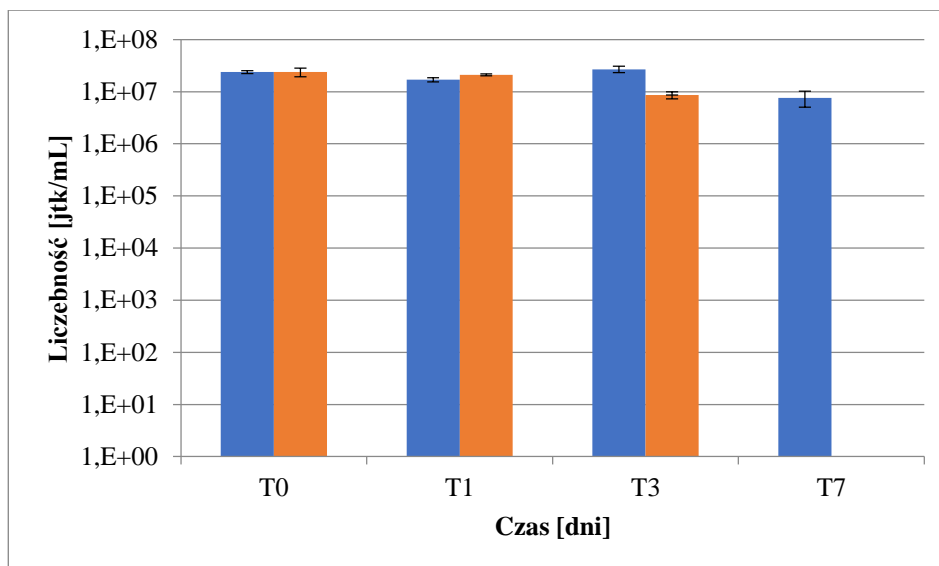
Ryc. 59. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieku KK z drożdżami *Hansenula polymorpha* (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + drożdże)



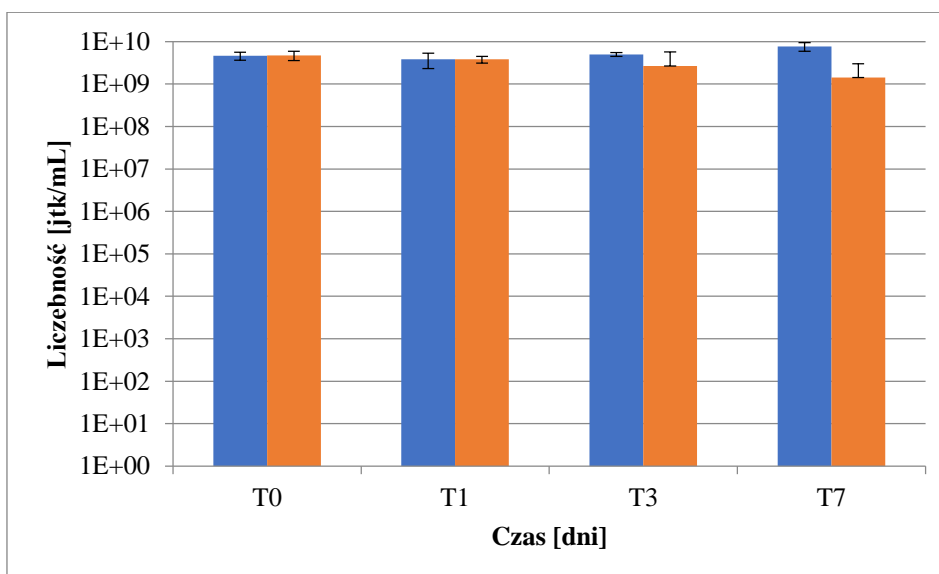
Ryc. 60. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieku KK z z drożdżami *Saccharomyces cerevisiae* (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + drożdże)



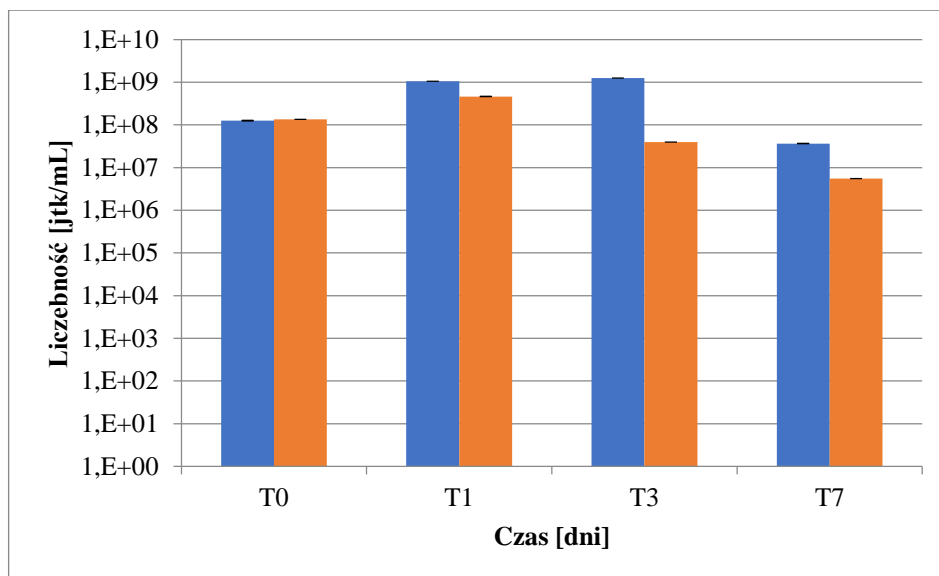
Ryc. 61. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieku KK z drożdżami *Trichosporon sp.* (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + drożdże)



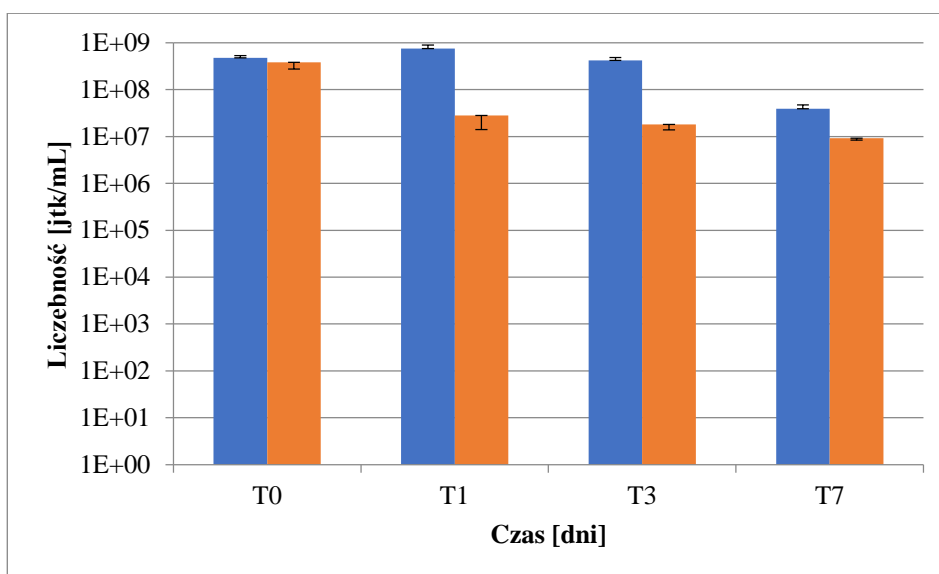
Ryc. 62. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieku KK z drożdżami *Yarrowia lipolytica* (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + drożdże)



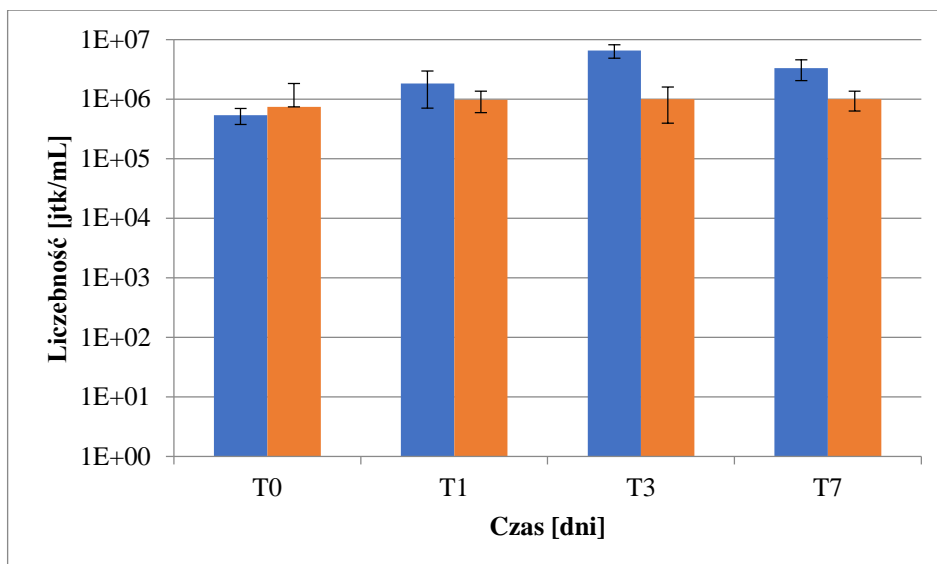
Ryc. 63. Dynamika populacji bakterii podczas inkubacji odcieku KK z konsorcjum SB (*Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Rhizobium radiobacter*) (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + konsorcjum)



Ryc. 64. Dynamika populacji bakterii podczas inkubacji odcieku KK z biocenozą ZB-01 (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + konsorcjum)



Ryc. 65. Dynamika populacji bakterii podczas inkubacji odcieku KK z bakteriami *Zoogloea ramigera* (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + bakterie)



Ryc. 66. Dynamika populacji bakterii wolnożyjących podczas inkubacji odcieku KK z osadem czynnym (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + osad czynny)



Ryc. 67. Obraz mikroskopowy przedstawiający osad czynny po 7 dniach inkubacji w warunkach napowietrzania, 400x



Ryc. 68. Obraz mikroskopowy przedstawiający osad czynny po 7 dniach inkubacji w warunkach napowietrzania z odciekiem KK, 400x

Tabela 27. Wartość indeksu osadowego Mohlmana w inkubowanej próbce osadu czynnego (Kontrola) oraz w próbce po 7-dniowej inkubacji z odciekem KK. Osad czynny dobrze pracujący charakteryzuje się wartością indeksu w granicach 80-120 mL/g s.m.

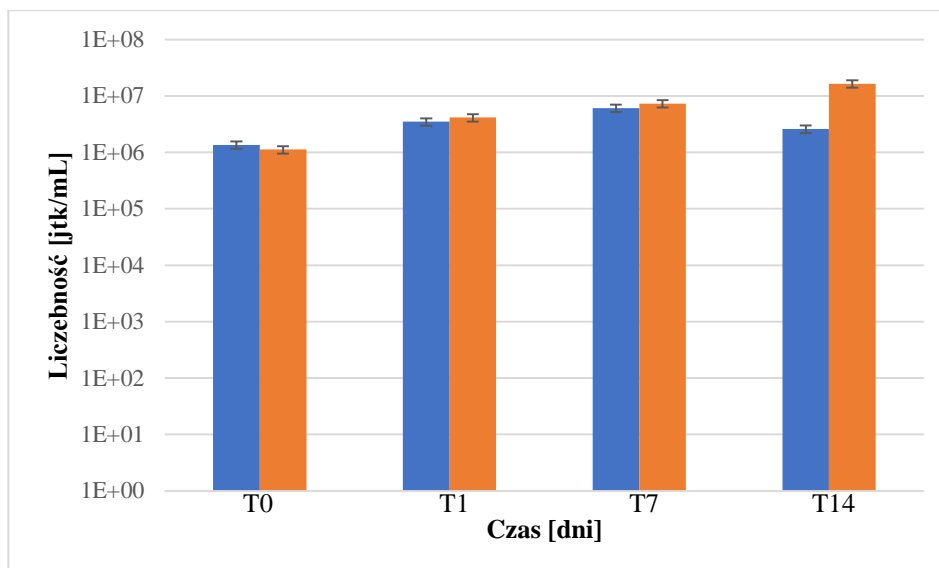
Wariant:	Indeks osadowy Mohlmana [mL/g s.m.]:
Osad czynny – kontrola	89,33 ± 1,53
Osad czynny po inkubacji z odciekem KK	83,83 ± 0,76

Odciek KK, pomimo profilu zanieczyszczeń podobnego do wcześniej badanej cieczy BB, nie wykazywał tak wysokiego poziomu toksyczności. Był on jednak wysoce zanieczyszczony azotem amonowym, co wciąż uniemożliwiało wprowadzenie tego strumienia do systemu konwencjonalnej biologicznej oczyszczalni ścieków bądź bezpośrednio do środowiska. W testach przeżywalności, podobnie jak w przypadku odcieku BB, wyróżniał się szczep drożdży *Trichosporon* sp., który wykazywał tolerancję na ścieki na poziomie próby kontrolnej, w związku z czym szczep ten przeznaczono do systematycznie prowadzonych testów oczyszczania odcieku KK (pkt. 4.3.2.4 – 4.3.2.5).

4.3.2.4 Oczyszczanie odcieku przy użyciu drożdży *Trichosporon* sp.

Głównym celem biologicznej remediacji odcieku KK była eliminacja związków biogennych, przede wszystkim azotu amonowego, ponieważ stwierdzona wysoka zawartość tej formy azotu, w przypadku przedostania się odcieku do środowiska, mogłaby spowodować eutrofizację okolicznych zbiorników wodnych. Należy tu podkreślić, że niezależnie prowadzona seria testów inkubacji odcieku KK z osadem czynny nie przyniosła oczekiwanego efektu znaczącej redukcji zawartości azotu [dane nieprezentowane].

W związku z powyższym zdecydowano się wykorzystać potencjał szczepu *Trichosporon* sp., który jako jedyne drożdże były zdolne przetrwać w środowisku odcieku KK przez okres 7 dni.



Ryc. 69. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieku KK z drożdżami *Trichosporon* sp. (niebieskie słupki – kontrola, pomarańczowe – odciek + drożdże)

Tabela 28. Charakterystyka odcieku KK poddanego procesowi oczyszczania przez drożdże *Trichosporon* sp.

Parametr	ChZT [mg O ₂ /L] – wariant kontrolny, niezaszczepiony	NH ₄ ⁺ – N [mg/L]
Wariant		
KK surowy T0	389,67 ± 2,52 a	986 ± 10,14 a
odciek KK po inkubacji z autochtonami	378,50 ± 9,89 a	620,00 ± 14,75 b
odciek KK + drożdże <i>Trichosporon</i> sp.	901,33 ± 2,08 b	848,33 ± 18,93 b

Wyniki liczebności drożdży *Trichosporon* sp. w trakcie eksperymentu oczyszczania, ponownie potwierdziły, że szczep ten jest zdolny do namnażania się w środowisku odcieku (ryc. 69). Badane parametry odcieku nie uległy znacznemu obniżeniu. Zawartość azotu amonowego obniżyła się o zaledwie 14%. Nastąpił natomiast wzrost poziomu ChZT (tab. 28). Zjawisko to obserwowano już wcześniej, w przypadku odcieku BB i wynikało ono z dodatku biomasy drożdży do odcieku.

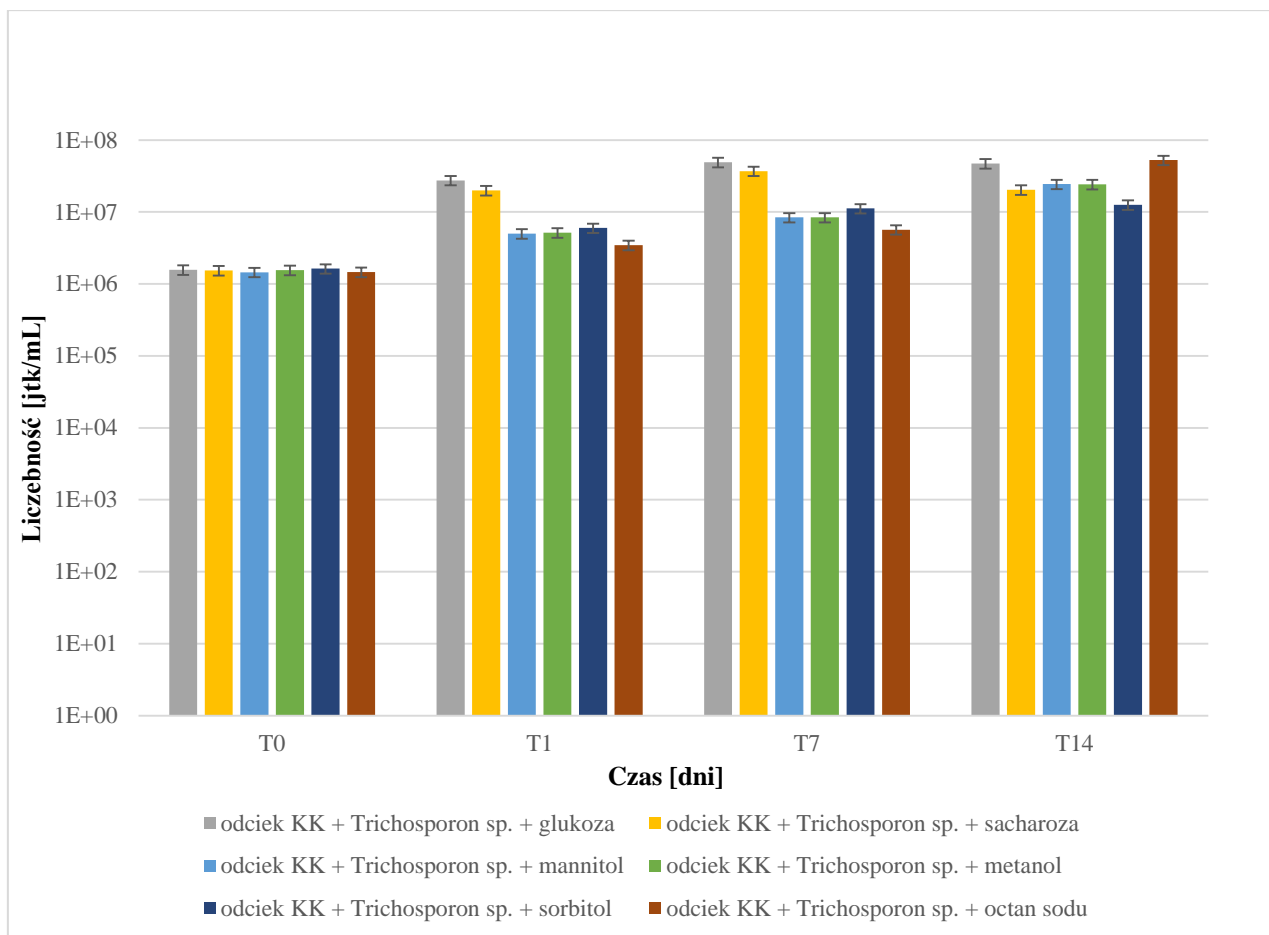
4.3.2.5 Oczyszczanie odcieku przy użyciu drożdży *Trichosporon* sp. z uwzględnieniem suplementacji odcieku dodatkiem węgla pochodzącego z różnych źródeł

Ze względu na brak spadku azotu amonowego podczas przeprowadzonych testów oczyszczania odcieku przez drożdże *Trichosporon* sp., postanowiono zmodyfikować odciek KK, w taki sposób, aby jego oczyszczanie było bardziej efektywne. Celowo zwiększono wartość ChZT, co uzyskano poprzez dodatek różnych źródeł węgla. Oznaczony w odcieku surowym niski poziom ChZT wiązał się z bardzo niekorzystnym stosunkiem C:N. Drobnoustroje do namnażania się potrzebują prawidłowego stosunku C:N, który wynosi ok. 20 [Sharma i Bhatii 2022]. W przypadku odcieku KK wartość ta wynosiła 0,4.

Do podwyższenia zawartości węgla w odcieku KK wykorzystano następujące związki: glukoza, sacharoza, mannitol, sorbitol, octan sodu i metanol. Ilości jakie dodawano do odcieku obliczono na podstawie masy molowej poszczególnych związków oraz stężenia użytych roztworów i wyniosły one kolejno: 25,0 mg/mL dla glukozy, 23,8 mg/mL dla sacharozy, 25,3 mg/mL dla mannitolu i sorbitolu, 34,2 mg/mL dla octanu sodu oraz 35,0 μ L/mL dla metanolu (roztwór 96%).

W wyniku suplementacji zamierzano osiągnąć wartość ChZT równą 10 000 mg O₂/L, co podniosło stosunek C:N do ok. 10. Stosunek ten wciąż był niższy od wartości optymalnej, jednakże w doświadczeniach przeprowadzonych na odciekach B oraz E zauważono znaczny spadek wartości azotu amonowego już przy podobnych stosunkach (Patrz pkt. 4.1). Istotną kwestią były również kwestie ekonomiczne, wysokie koszty oczyszczania w przypadku wdrożenia testowanego rozwiązania mogłyby uniemożliwić jego implementację do przemysłowego zastosowania.

Wydłużono również czas doświadczenia do 14 dni, aby zwiększyć końcową wydajność procesu oczyszczania. Na początku eksperymentu (T0) oraz po 1, 7 i 14 dniach (T1, T7 i T14) analizowano liczebność drożdży, która we wszystkich wariantach rosła (ryc. 70) Znaczący wzrost liczebności drożdży świadczył o korzystnych warunkach dla ich proliferacji, co zgadza się z poczynionymi założeniami.



Ryc. 70. Dynamika populacji drożdży *Trichosporon* sp. podczas inkubacji odcieku KK suplementowanego różnymi źródłami węgla

Wykonane analizy zawartości poszczególnych związków wskazały, że suplementacja alternatywnymi źródłami węgla pozytywnie wpłynęła na proces oczyszczania odcieku KK z azotu amonowego. Szczególnie efektywne okazało się dokarmianie octanem sodu. Wartość azotu amonowego w tym przypadku spadła o niemal 85% względem wartości początkowej (tab. 29). Osiągnięta wydajność była 6-krotnie wyższa niż podczas oczyszczania odcieku KK z wykorzystaniem drożdży *Trichosporon* sp. bez suplementacji (tab. 28).

Tabela 29. Wyniki oczyszczania odcieku KK przez drożdże *Trichosporon* sp. w warunkach suplementacji wariantowymi źródłami węgla

Wariant \ Parametr	ChZT [mg O ₂ /L] Wartość początkowa	ChZT [mg O ₂ /L] po 14-dniowej inkubacji z drożdżami <i>Trichosporon</i> sp.	NH ₄ ⁺ – N [mg/L] po 14-dniowej inkubacji z drożdżami <i>Trichosporon</i> sp.
nietraktowany odciek KK		389,67 ± 2,52* a	986 ± 10,14* a
odciek KK + sacharoza + <i>Trichosporon</i> sp.	10983,33 ± 951,75	1761,67 ± 29,30 b	431,67 ± 10,41 b
odciek KK + glukoza + <i>Trichosporon</i> sp.	10363,33 ± 151,77	1748,33 ± 12,58 b	478,67 ± 11,59 b
odciek KK + mannitol + <i>Trichosporon</i> sp.	11500,00 ± 500	1063 ± 33,00 c	445,00 ± 22,91 b
odciek KK + sorbitol + <i>Trichosporon</i> sp.	10413,33 ± 197,57	1160 ± 23,64 c	452,67 ± 34,08 b
odciek KK + octan sodu + <i>Trichosporon</i> sp.	9893,33 ± 110,15	2283,67 ± 7,77 d	150,92 ± 25,44 c
odciek KK + metanol + <i>Trichosporon</i> sp.	11333,33 ± 251,66	1995,67 ± 12,50 e	335,00 ± 18,02 d

*wartość początkowa

4.4 Badania cieczy pofermentacyjnych powstałych podczas fermentacji ciemnej w modelowej instalacji wytwarzania biowodoru

4.4.1 Analiza fizykochemiczna i mikrobiologiczna odcieków

Badane odcieki otrzymane w wyniku procesu fermentacji ciemnej poddano wstępnej charakterystyce. W tym celu określono poziom chemicznego zapotrzebowania tlenu, stężenie kwasów organicznych, stężenie fosforu ogólnego i azotu ogólnego oraz liczebność drobnoustrojów autochtonicznych (tab. 30). Badania wykazały, że wszystkie odcieki charakteryzowały się bardzo wysoką zawartością materii organicznej, w tym zwłaszcza krótkołańcuchowych kwasów organicznych (VFA ang. *Volatile fatty acids*). We wszystkich odciekach przekroczony był również poziom fosforu ogólnego, w tym w dwóch przypadkach (MP+, TP+) wielokrotnie [Rozporządzenie Ministra Gospodarki Morskiej i Żeglugi Śródlądowej 2019].

Tabela 30. Charakterystyka surowych odcieków powstałych w procesie ciemnej fermentacji

Odciek	Parametr				
	ChZT [mg O ₂ /L]	Kwasy organiczne* [mg/L]	Stężenie fosforu ogólnego [mg/L]	Stężenie azotu ogólnego [mg/L]	Liczebność mikroorganizmów autochtonicznych [jtk/mL]
MP+	41709,33 ± 1116,86	6066,67 ± 181,48	1325,77 ± 152,95	336,33 ± 63,79	1,04 · 10 ⁵ jtk/mL
MP-	37866,67 ± 1703,92	12285,33 ± 1907,83	35,97 ± 5,17	25,1 ± 2,65	4,04 · 10 ⁷ jtk/mL
TP+	41833,33 ± 1582,19	6246,67 ± 254,82	72,67 ± 11,24	32,6 ± 2,42	2,88 · 10 ⁷ jtk/mL
TP-	37316,67 ± 596,52	14034,00 ± 60,23	33,53 ± 2,16	22 ± 2,65	3,58 · 10 ⁷ jtk/mL

*głównie kwas octowy, propionowy i butanowy

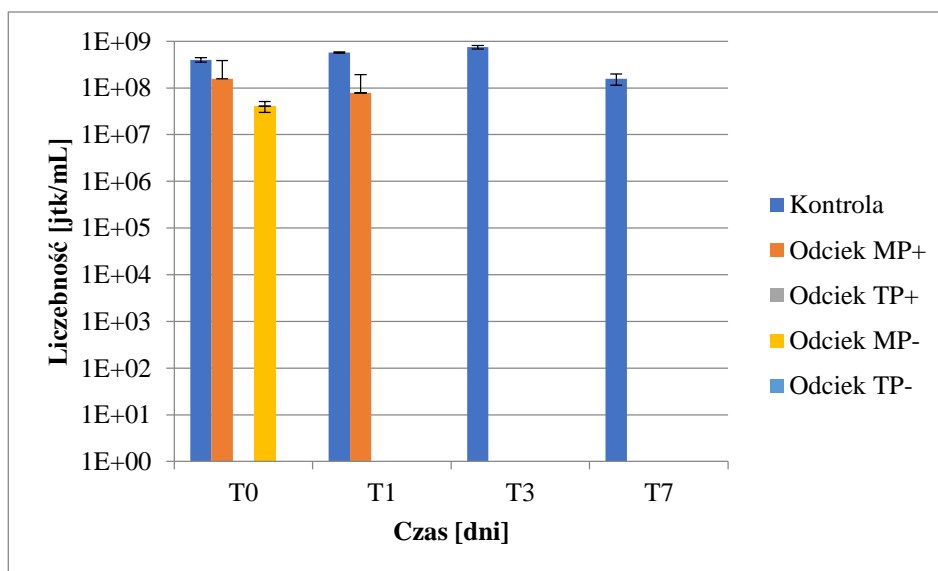
Zgodnie z literaturą [Cieciura-Włoch i Borowski 2019; Borowski i Kucner 2019] i wynikami analiz przeprowadzonych na Politechnice Łódzkiej przez grupę kierowaną przez Sebastiana Borowskiego [Cieciura-Włoch i in. 2020], w skład organicznych kwasów tłuszczowych występujących w odciekach powstałych po fermentacji wodorowej wchodzi głównie kwas octowy, masłowy, kapronowy oraz w mniejszych ilościach kwas walerianowy,

propionowy oraz heptanowy. Istnieją liczne doniesienia o toksyczności wymienionych wyżej związków na mikroorganizmy [Wilbanks i Trinh 2017; Candry i in. 2020].

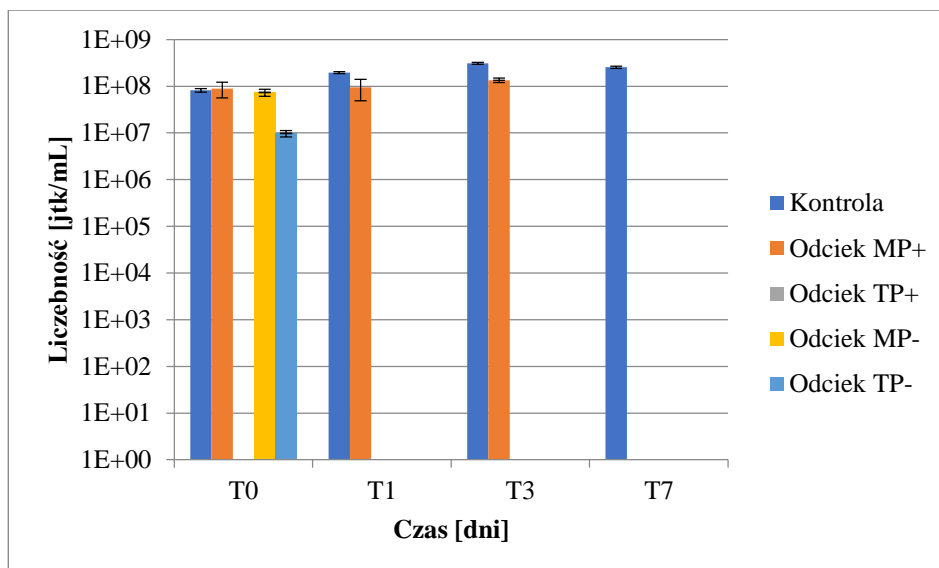
Liczebności mikrobioty autochtonicznej wyniosły kolejno: $1,04 \cdot 10^5$ jtk/mL – odciek MP+, $4,04 \cdot 10^7$ jtk/mL – odciek MP-, $2,88 \cdot 10^7$ jtk/mL – TP+, $3,58 \cdot 10^7$ jtk/mL – TP-. Niska liczebność drobnoustrojów w odcieku MP+ może być związane ze stosunkowo wysokim poziomem fosforu w tym odcieku. Testy oczyszczania z wykorzystaniem drobnoustrojów autochtonicznych przedstawiono w pkt. 4.4.5.

4.4.2 Badania toksyczności odcieków względem bakterii allochtonicznych

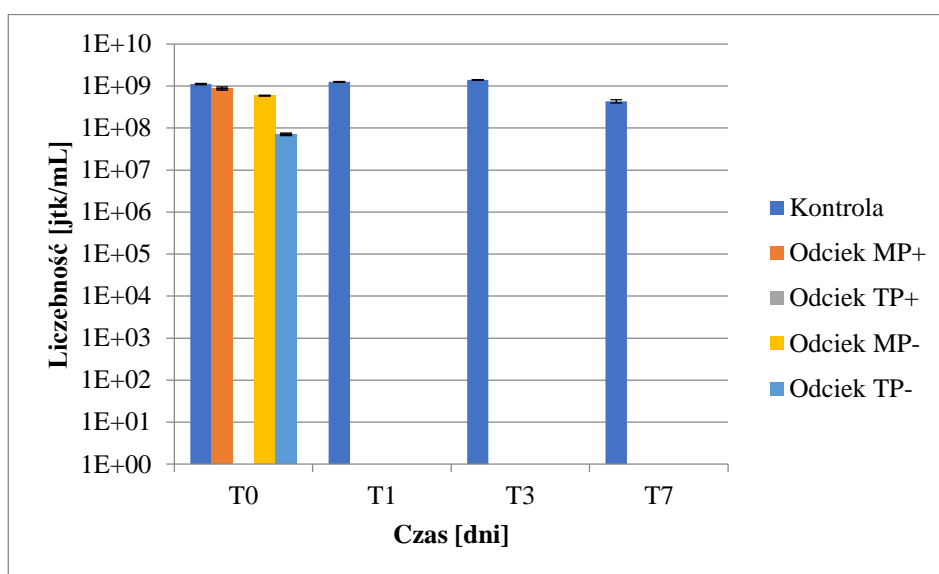
Kolejne doświadczenia skupiły się na testach toksyczności odcieków wobec wybranych bakterii środowiskowych, allochtonicznych: monokultury bakterii *Pseudomonas* sp. 18, monokultury bakterii *Zoogloea ramigera* konsorcjum bakteryjnego ZB-01, konsorcjum bakterii glebowych SB (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Rhizobium radiobacter*). W tym celu badane odcieki inkubowano w stosunku objętościowym 9:1 z biomasa poszczególnych drobnoustrojów przez okres 7 dni. Równolegle prowadzono obserwacje kontrolne hodowli inkubowanych w płynnym podłożu minimalnym (BH) (ryc. 71 – 74).



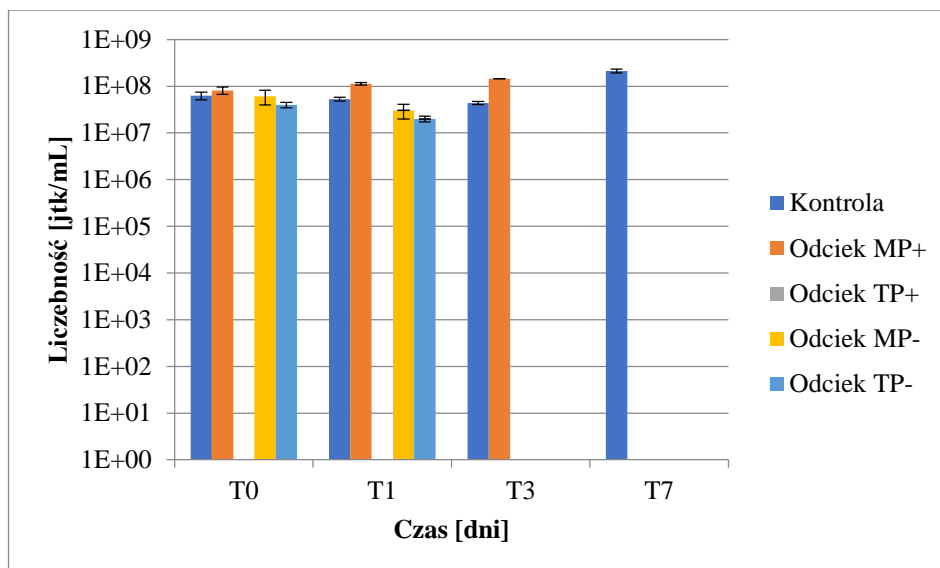
Ryc. 71. Dynamika populacji bakterii podczas inkubacji odcieków po fermentacji wodorowej z bakteriami *Pseudomonas* sp. 18



Ryc. 72. Dynamika populacji bakterii podczas inkubacji odcieków po fermentacji wodorowej z bakteriami *Zoogloea ramigera*



Ryc. 73. Dynamika populacji bakterii podczas inkubacji odcieków po fermentacji wodorowej z konsorcjum SB



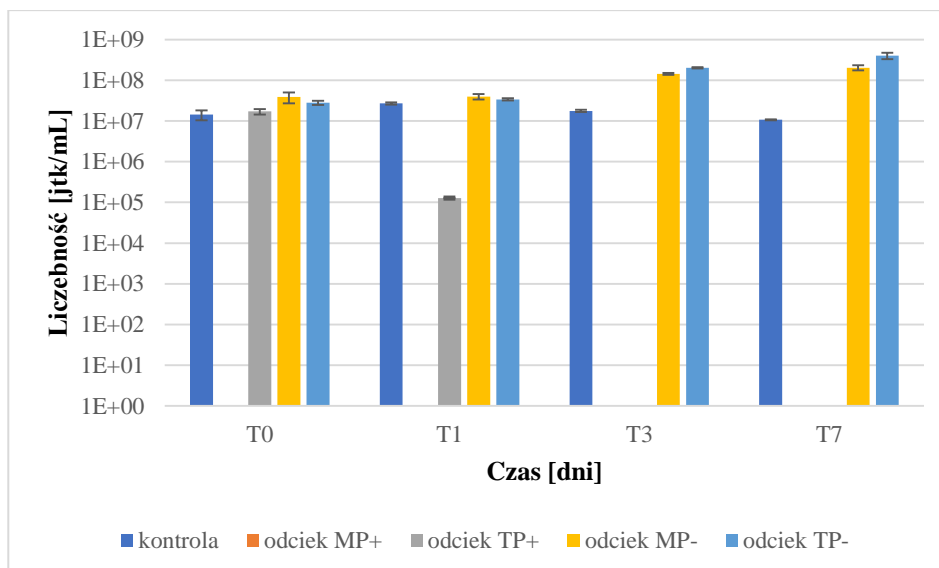
Ryc. 74. Dynamika populacji bakterii podczas inkubacji odcieków po fermentacji wodorowej z konsorcjum ZB-01

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń wykazano, iż odcieki wykazały się silną toksycznością względem wybranych szczepów bakterii i konsorcjów bakteryjnych (ryc. 71-74). Najwyższym poziomem toksyczności charakteryzował się odciek TP+, w każdym z badanych wariantów, bakterie ginęły bezpośrednio po zmieszaniu z odciekiem. Odcieki TP- i MP- wykazywały podobny poziom oddziaływania na badane bakterie, poza jednym wariantem ze szczepem *Pseudomonas* sp. 18, gdzie odciek TP- wykazał się toksycznością natychmiastową bezpośrednio po zmieszaniu z bakteriami (ryc. 71). W odcieku MP+ bakterie były zdolne utrzymywać żywotność najdłużej, jednakże, w każdym przypadku nie były zdolne do przetrwania w środowisku odcieku przez cały okres prowadzenia eksperymentu.

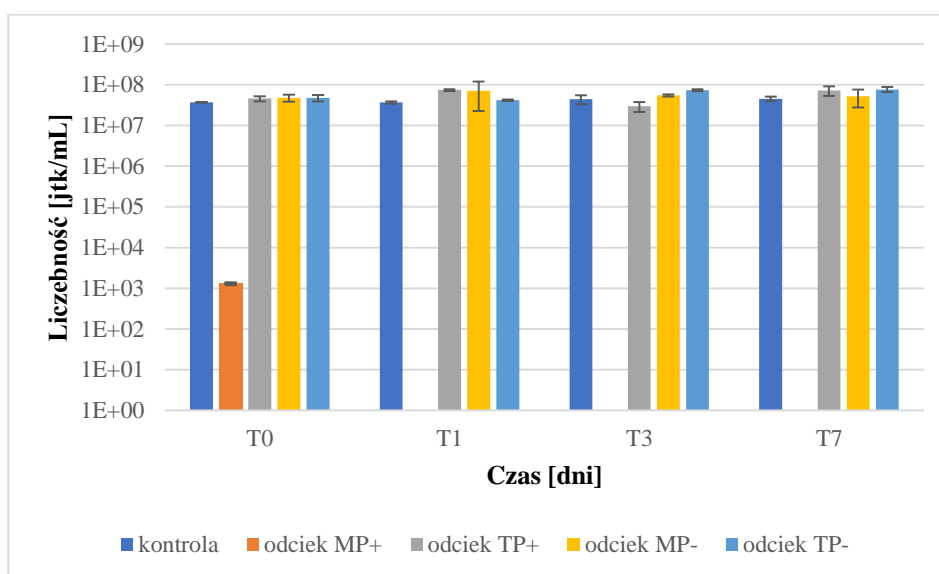
Przedstawione wyniki jednoznacznie wskazują na toksyczny wpływ odcieków powstałych po fermentacji wodorowej na bakterie środowiskowe oraz przedstawiciela bakterii zooglealnych, występujących w osadzie czynnym (*Zoogloea ramigera*). Wskazuje to na duże zagrożenie w razie odprowadzania tego typu ścieków bezpośrednio do środowiska.

4.4.3 Określenie toksyczności względem drożdży

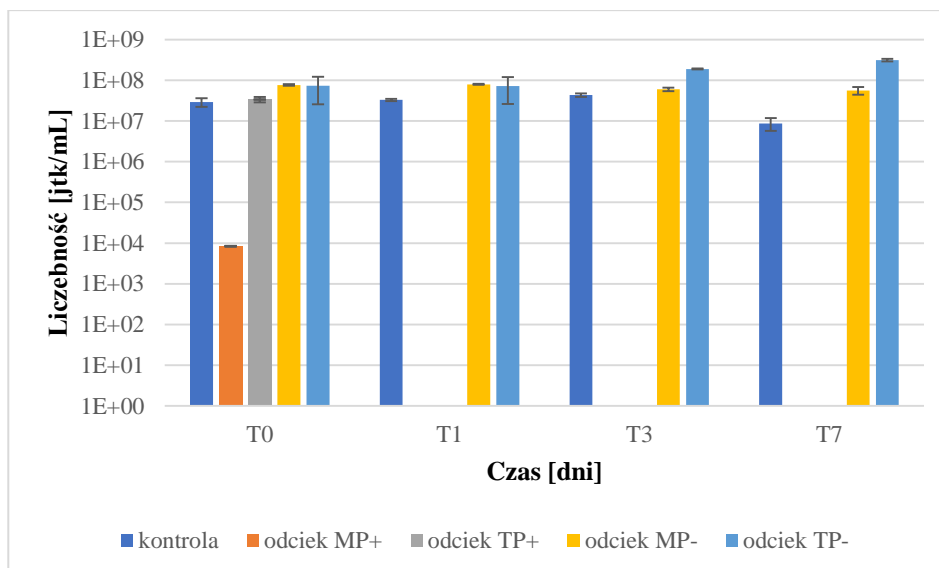
Kolejne doświadczenia skupiły się na testach toksyczności odcieków względem wybranych gatunków drożdży niekonwencjonalnych: *Candida* sp. D11, *Trichosporon* sp., *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula polymorpha* oraz konwencjonalnych *Saccharomyces cerevisiae*. W tym celu badane odcieki inkubowano, jak wyżej, w stosunku objętościowym 9:1 z wyhodowaną biomasą poszczególnych drożdży przez okres 7 dni. W trakcie doświadczenia prowadzono również obserwacje kontrolne hodowli inkubowanych w płynnym podłożu (YCU) (ryc. 75 – 79).



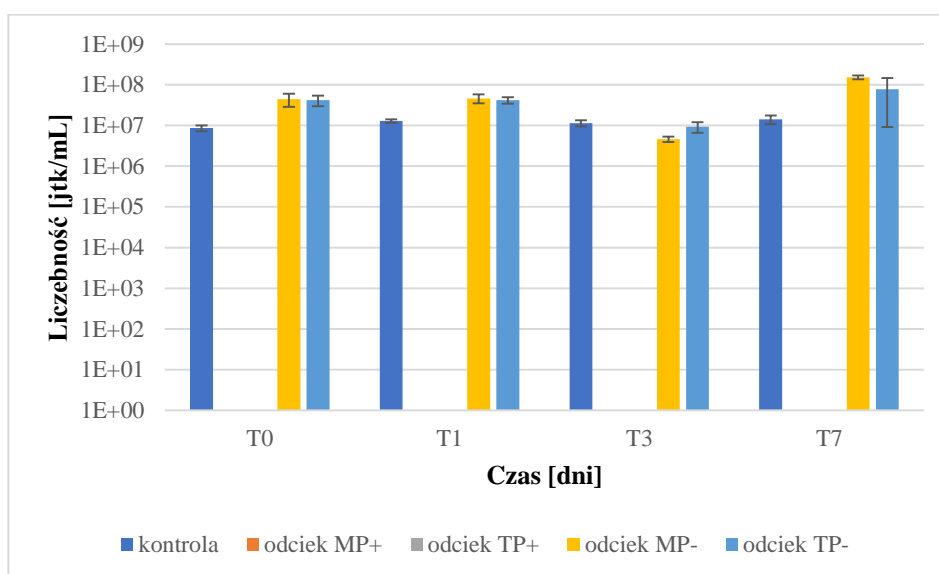
Ryc. 75. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieków po fermentacji wodorowej z drożdżami *Candida* sp. D11



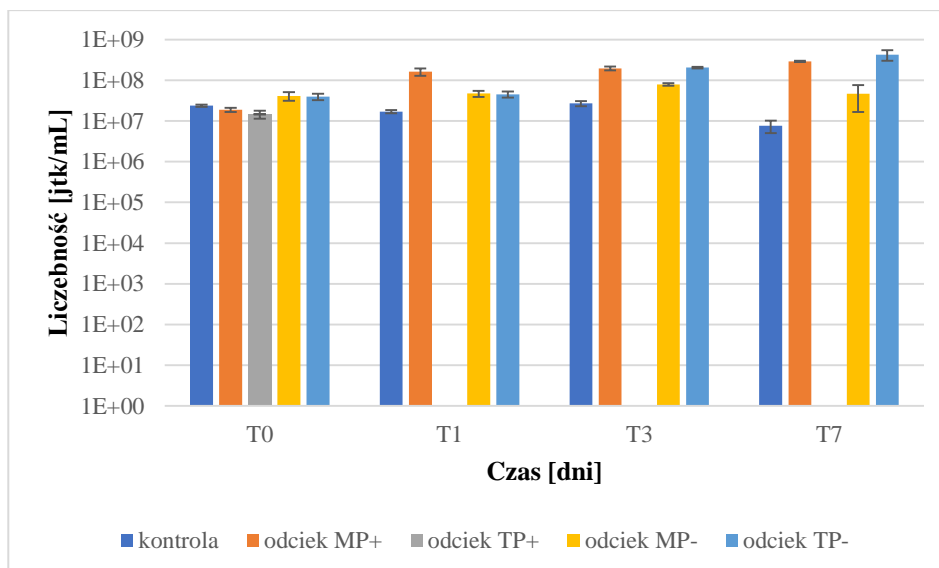
Ryc. 76. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieków po fermentacji wodorowej z drożdżami *Saccharomyces cerevisiae*



Ryc. 77. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieków po fermentacji wodorowej z drożdżami *Hansenula polymorpha*



Ryc. 78. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieków po fermentacji wodorowej z drożdżami *Trichosporon sp.*



Ryc. 79. Dynamika populacji drożdży podczas inkubacji odcieków po fermentacji wodorowej z drożdżami *Yarrowia lipolytica*

Przeprowadzone doświadczenia świadczą o tym, że odcieki MP+ i TP+ były wysoce toksyczne względem testowanych drożdży. Jedynie drożdże *Yarrowia lipolytica* były zdolne do utrzymania liczebności przez 7-dniowy okres inkubacji w odcieku MP+. Z kolei, odciek TP+ nie był toksyczny dla drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Odcieki MP- i TP-, w przeciwieństwie do MP+ i TP+, nie wykazywały efektu toksycznego wobec drożdży (ryc. 75 – 79).

W związku z wynikami doświadczeń przedstawionymi w pkt. 4.4.2 i 4.4.3, konieczne jest podjęcie kroków mających na celu wstępne oczyszczenie uzyskanych cieczy pofermentacyjnych, gdyż wprowadzenie ich do klasycznej oczyszczalni ścieków mogłoby wpłynąć na pogorszenie parametrów pracy osadu czynnego.

4.4.4 Biologiczne oczyszczanie cieczy pofermentacyjnych z produkcji biowodoru. Wykorzystanie drożdży *Yarrowia lipolytica* do bioremediacji toksycznego odcieku MP+

Wykonano analizy poziomu ChZT i zawartości fosforu w próbkach poddanych inkubacji z odciekami MP+, TP+, MP-, TP-, w których drożdże były zdolne do przeżycia w środowisku odcieku przez cały okres prowadzenia doświadczenia (patrz pkt. 4.4.3). Tak więc, przeprowadzono badania dla wszystkich wariantów w przypadku odcieków TP- i MP- (ryc. 75 – 79) oraz wariantu zawierającego drożdże *Yarrowia lipolytica* dla odcieku MP+ (ryc. 79).

Parametry odcieków MP- i TP- w każdym z wariantów nie uległy istotnej zmianie [dane nieprezentowane]. Z kolei w przypadku odcieku MP+, drożdże *Yarrowia lipolytica*, jako tolerujące skrajnie niekorzystne, toksyczne środowisko, były zdolne do istotnego obniżenia zawartości zanieczyszczeń. Efektywność oczyszczania wyniosła w tym przypadku kolejno:

54% wartości początkowej fosforu ogólnego i 72% wartości początkowej poziomu materii organicznej (tab. 31).

Tabela 31. Wyniki analiz biologicznego oczyszczania odcieku MP+ przez drożdże *Yarrowia lipolytica*

Oznaczany parametr	Odciek MP+ nietraktowany	Odciek MP+ po 7-dniowej inkubacji z drożdżami <i>Yarrowia lipolytica</i>
PO ₄ ³⁻ - P [mg/L]	1325,77 ± 152,95	739,33 ± 19,50
ChZT [mg O ₂ /L]	41709,33 ± 1116,86	11600,00 ± 217,94

4.4.5 Biologiczne oczyszczanie cieczy pofermentacyjnych z produkcji biowodoru. Opracowanie konsorcjum zdolnego do oczyszczania cieczy pofermentacyjnych w oparciu o drobnoustroje autochtoniczne

4.4.5.1 Izolacja drobnoustrojów autochtonicznych

W kolejnym etapie prac badawczych skupiono się na wytworzeniu uniwersalnego konsorcjum mikroorganizmów, zdolnego do oczyszczania specyficznych, uciążliwych środowiskowo i potencjalnie toksycznych odcieków powstałych po fermentacji wodorowej. W tym celu wyizolowano mikroorganizmy autochtoniczne, które były obecne w odciekach (patrz: rozdział 4.4.1, tab. 30).

Izolację prowadzono techniką posiewu reducyjnego na płytki mikrobiologiczne zawierające agar wzbogacony w przypadku bakterii i podłoże SAB w przypadku drożdży. Odpowiednie objętości nierozcieńczonych surowych odcieków wysiano bezpośrednio na płytki z odpowiednim podłożem i inkubowano w temperaturze pokojowej. Po upływie czasu inkubacji pojedyncze kolonie wyrosłe na szalkach przesiewano, na świeże płytki, w celu ich oczyszczenia. Czynność tą powtarzano kilkakrotnie, w celu uzyskania czystych linii bakteryjnych.

W wyniku przeprowadzonej izolacji uzyskano 5 szczepów bakteryjnych (2 dla odcieku MP+, i po jednym dla odcieków TP+, MP- i TP-) oraz jeden izolat drożdżowy (odciek TP+). Dla każdej oczyszczonej kolonii rejestrowano morfologię, wielkość, kształt i wzorzec wzrostu (tab. 32).

Tabela 32. Opis cech morfologicznych kolonii poszczególnych izolatów bakterii pozyskanych z odcieków pofermentacyjnych (MP+, MP-, TP+, TP-)

Szczep wyizolowany z odcieku po fermentacji wodorowej (odciek, z którego wyizolowano szczep)	Morfotyp kolonii
<i>Bacillus cereus</i> (TP-)	Kształt kolonii: okrągły; Wyniosłość kolonii: wzniesiona; Brzeg: zatokowaty; Powierzchnia: gładka; Przezroczystość: nieprzezroczyste; Kolor: biały
<i>Bacillus cereus</i> (MP-)	Kształt kolonii: nieregularny; Wyniosłość kolonii: wypukła; Brzeg: zatokowaty; Powierzchnia: gładka; Przezroczystość: nieprzezroczyste; Kolor: biały
<i>Brevibacillus parabrevis</i> (TP+)	Kształt kolonii: gwiazdkowaty; Wyniosłość kolonii: wypukła; Brzeg: falisty; Powierzchnia: gładka; Przezroczystość: nieprzezroczyste; Kolor: biały
<i>Lisinibacillus sphaericus</i> I (MP+)	Kształt kolonii: okrągły; Wyniosłość kolonii: stożkowata; Brzeg: równy; Powierzchnia: błyszcząca; Przezroczystość: nieprzezroczyste; Kolor: biały
<i>Lisinibacillus sphaericus</i> II (MP+)	Kształt kolonii: okrągły; Wyniosłość kolonii: stożkowata; Brzeg: równy; Powierzchnia: błyszcząca; Przezroczystość: nieprzezroczyste; Kolor: beżowy
<i>Candida krusei</i> (TP+)	Kształt kolonii: okrągły; Wyniosłość kolonii: wypukła; Brzeg: równy; Powierzchnia: matowa; Przezroczystość: nieprzezroczyste; Kolor: biały

4.4.5.2 Identyfikacja drobnoustrojów autochtonicznych

Wyizolowane szczepy poddano biochemicznej identyfikacji. W tym celu, świeże, 24-godzinne hodowle, znajdujące się na szalkach z odpowiednim podłożem (AW – dla bakterii, SAB – dla izolatu drożdżowego) przekazano do Laboratorium Mikrobiologicznego, Jagiellońskiego Centrum Innowacji, gdzie przy użyciu systemu MALDI Biotyper drobnoustroje poddano identyfikacji techniką MALDI-TOF MS poprzez pomiar unikatowych białek. Uzyskane widma białek poszczególnych drobnoustrojów porównano z biblioteką widm i na tej podstawie określono ich przynależność do danego gatunku. Wartość wskaźnika identyfikacji uzyskana dla każdego z identyfikowanych szczepów była wyższa niż 1,69 (poniżej tej wartości brak jest możliwości identyfikacji), a trzy z nich posiadały wskaźnik identyfikacji powyżej 2,00, co świadczyło o wysokiej pewności dopasowania (tab. 33).

Tabela 33. Wyniki identyfikacji wyizolowanych drobnoustrojów metodą MALDI-TOF

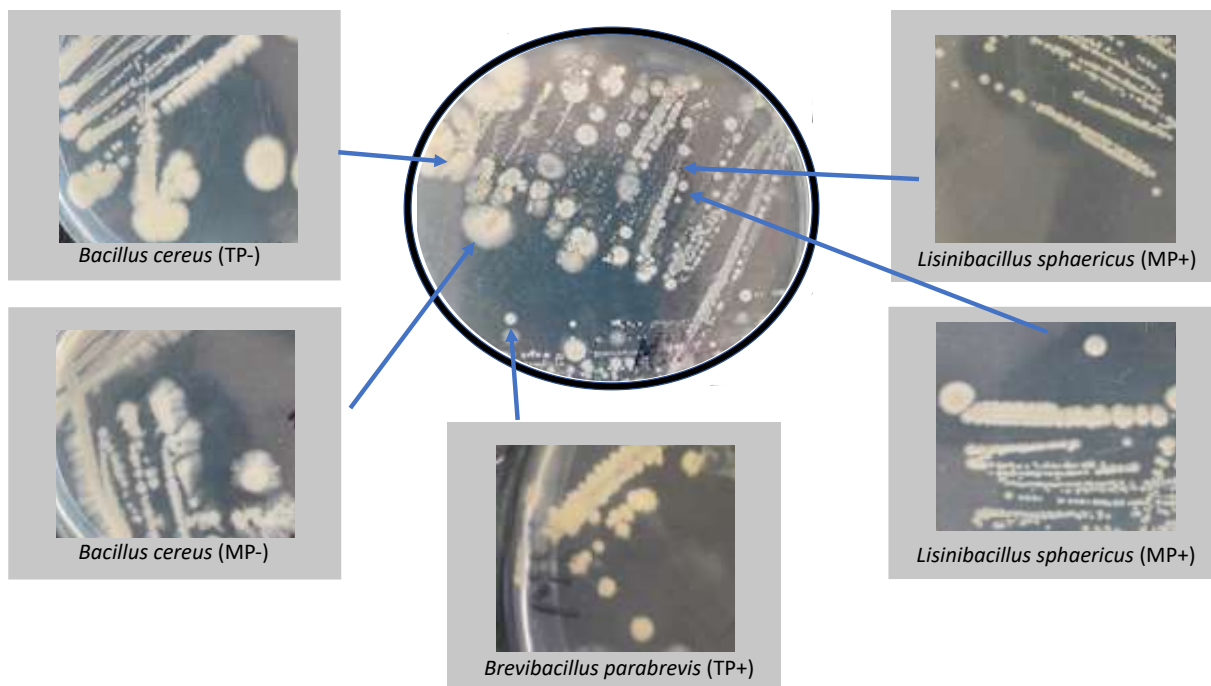
Odciek	Zidentyfikowany szczep	MALDI-TOF Wartość wskaźnika identyfikacji	NCBI
MP+	<i>Lisinibacillus sphaericus</i> MP1	1.82	1421
	<i>Lisinibacillus sphaericus</i> MP2	1.86	1421
MP-	<i>Bacillus cereus</i> M1	2.20	1396
TP+	<i>Brevibacillus parabrevis</i>	2.16	54914
	<i>Candida krusei</i>	2.36	4909
TP-	<i>Bacillus cereus</i> T1	1.86	1396

Każdy szczep po izolacji i identyfikacji metodą MALDI-TOF umieszczono w kolekcji mikroorganizmów Zespołu Biochemii Katedry Biologii Roślin i Biotechnologii, załączając szczegółowy opis ustalonych optymalnych warunków hodowli oraz cech morfologicznych (tab. 29).

Następnie wszystkie zidentyfikowane izolaty autochtoniczne wykorzystano do opracowania ukierunkowanego konsorcjum mikrobiologicznego, mającego na celu biologiczne oczyszczanie toksycznych odcieków pofermentacyjnych produkcji biowodoru.

4.4.5.3 Konstrukcja aktywnego konsorcjum mikrobiologicznego

W celu uzyskania aktywnego konsorcjum mikrobiologicznego, poszczególne szczepy autochtoniczne, wyizolowane z odcieków, hodowano w osobnych kolbach w podłożu płynny (SNB – dla bakterii i YCU – dla drożdży), aż do uzyskania wysokich gęstości biomasy (OD₆₀₀ ok 2,5 dla bakterii i OD₅₄₀ ok. 3,0 dla drożdży). Następnie zawiesiny wirowano (przy 7000 obr./min (bakterie) lub 3500 obr./min (drożdże)) przez 10 min, zmieszano w równym stosunku objętościowym i wprowadzono bezpośrednio do odcieków.



Ryc. 80. Schemat przedstawiający izolaty bakteryjne pozyskane z poszczególnych odcieków (szare kwadraty) oraz wspólny wzrost kolonii bakterii na szalce po integracji hodowli w celu wytworzenia aktywnego konsorcjum (czarne koło). Strzałkami zaznaczono poszczególne izolaty wchodzące w skład konsorcjum [Fot. własne]

- *Candida krusei* (TP+)



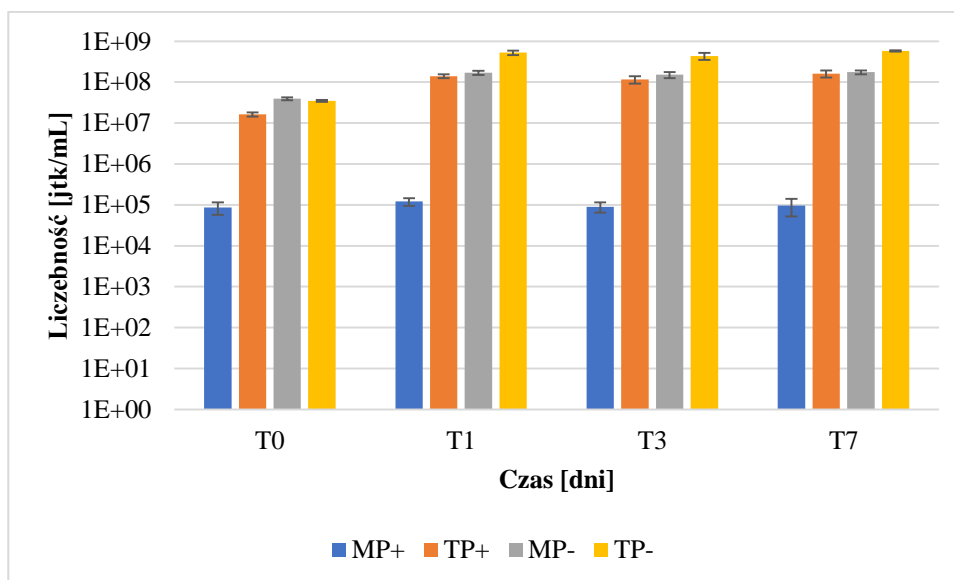
Ryc. 81. Zdjęcie przedstawiające kolonie drożdży wyizolowanych z odcieku TP+ [Fot. własna]

Obecność poszczególnych komponentów w konsorcjum drobnoustrojów wyizolowanych z odcieków po ciemnej fermentacji (DFMC ang. *Dark Fermentation Microbial Consortium*), potwierdzono poprzez analizę cech morfologicznych, po posianiu konsorcjum na podłoże stałe (AW i SAB) (ryc. 80 i 81).

4.4.5.4 Badania oczyszczania cieczy pofermentacyjnych z wykorzystaniem konsorcjum

Otrzymane konsorcjum DFMC (Patrz pkt. 4.4.5.3), zmieszano z poszczególnymi odciekami (MP+, TP+, MP-, TP-) w stosunku objętościowym 1:9. Doświadczenie prowadzono przez okres 7 dni w warunkach napowietrzania. Jako kontrolę monitorowano liczebność konsorcjum zmieszanego z płynnym podłożem minimalnym (BH) w stosunku 1:9. Dodatkowo surowe, nietraktowane odcieki rozcieńczono podłożem SNB w stosunku 9:1 i równolegle z inkubowano je przez okres całego eksperymentu w warunkach napowietrzania.

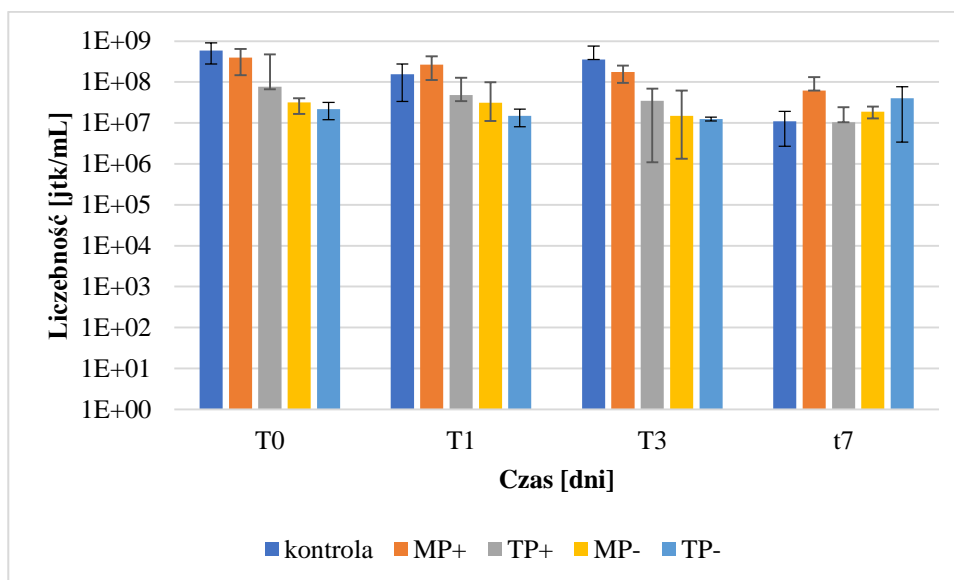
Dynamika liczebności bakterii autochotnicznych została przedstawiona na ryc. 82. Liczebność drobnoustrojów autochotnicznych w odcieku MP+ nie uległa zmianie w trakcie trwania eksperymentu. W przypadku pozostałych odcieków liczebność ta wzrosła ok. 10-krotnie (ryc. 82).



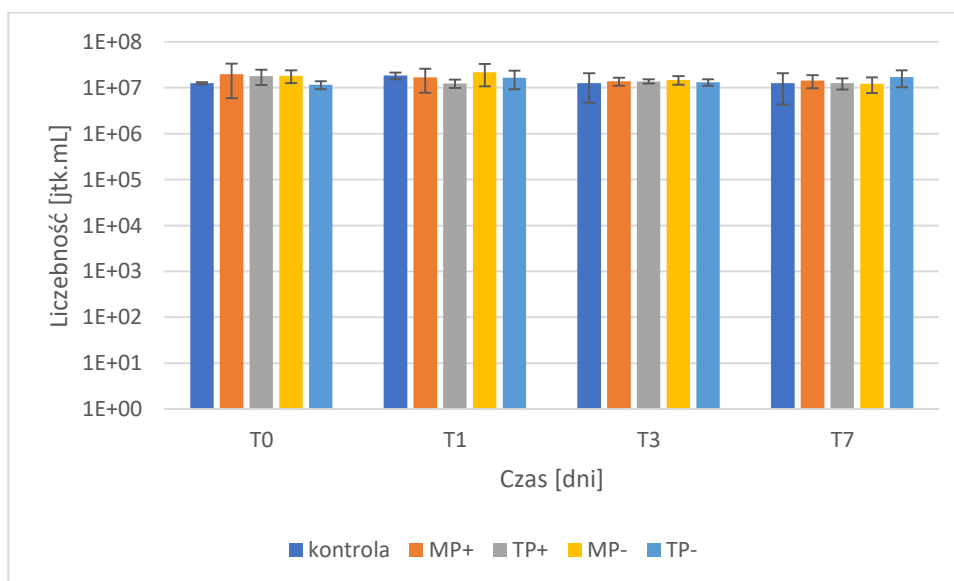
Ryc. 82. Dynamika liczebności bakterii autochotnicznych występujących w badanych odciekach MP+, TP+, MP- i TP- podczas 7-dniowej inkubacji w warunkach napowietrzania

Liczebność bakterii i drożdży wchodzących w skład konsorcjum DFMC utrzymywała się na poziomie podobnym do początkowego. Zaobserwowano jedynie niewielki spadek liczebności bakterii w 7. dniu prowadzenia eksperymentu (ryc. 83 i 84). Wyniki ten jest

zgodny z oczekiwaniami, ponieważ drobnoustroje wchodzące w skład konsorcjum DFMC pochodzą ze środowiska odcieków po fermentacji wodorowej, a zatem są zdolne do przetrwania w tym specyficznym środowisku.



Ryc. 83. Dynamika populacji bakterii w konsorcjum DFMC podczas inkubacji z odciekami po fermentacji wodorowej (słupki niebieskie – kontrola, pozostałe słupki – odcieki)



Ryc. 84. Dynamika populacji drożdży w konsorcjum DFMC podczas inkubacji z odciekami po fermentacji wodorowej (słupki niebieskie – kontrola, pozostałe słupki – odcieki)

Po zakończeniu doświadczenia próbki poddano analizie poszczególnych parametrów: ChZT, kwasy organiczne, fosfor ogólny i azot ogólny (tab. 34). Inkubacja odcieków nietraktowanych, mająca na celu wykorzystanie potencjału pierwotnej mikrobioty autochtonicznej, nie przyniosła satysfakcjonujących efektów usuwania związków biogenych (spadek azotu ogólnego między 1,5 a 26,4 % oraz spadek fosforu ogólnego między 0 a 16,3%).

Poziom ChZT istotnie uległ obniżeniu w przypadku odcieków MP- (76,2%), TP+ (76,6%) i TP- (62,7), jednak w przypadku odcieku MP+ spadł o jedyne 5,1%. Mniejszy stopień wydajności uzyskano z kolei w przypadku usuwania kwasów organicznych (5,8 – 47,1 %), które są postulowane jako główny czynnik toksyczności.

Wykorzystanie konsorcjum DFMC w oczyszczaniu odcieków sprawiło, że poziom azotu i fosforu ogólnego uległ znaczącemu obniżeniu (fosfor między 45,5 – 88,5%, azot między 59,9 – 83%) (tab. 34). Poziom tych związków w próbkach MP-, TP- i TP+ osiągał poziom dopuszczalnych norm [Rozporządzenie Ministra Gospodarki Morskiej i Żeglugi Śródlądowej 2019]. Bardzo wysoki stopień redukcji uzyskano w przypadku parametru ChZT i kwasów organicznych (ChZT – 80,5 – 87,1%, kwasy organiczne – 83,4 – 90%). Zaobserwowane spadki były przy tym porównywalne dla każdego z odcieków, co świadczy o uniwersalności działania konsorcjum DFMC.

Tabela 34. Wyniki oczyszczania odcieków po fermentacji wodorowej przez drobnoustroje autochtoniczne i wyspecjalizowane konsorcjum mikroorganizmów DFMC

Odciek	Parametr							
	ChZT [mg O ₂ /L]	Wyda jność [%]*	Kwasy organiczne [mg/L]	Wyda jność [%]*	Fosfor ogólny [mg/L]	Wyda jność [%]*	Azot ogólny [mg/L]	Wyda jność [%]*
Inkubacja z drobnoustrojami autochtonicznymi								
MP+	39566,67 ±1601,04 a	5,1	3565,33± 266,06 b	41,2	1146,00± 139,08 a	13,6	331,33 ± 10,26 a	1,5
MP-	9026,67± 513,94 b	76,2	7841,33± 346,42 b	36,2	31,37± 2,81a	12,8	24,33 ± 6,03 a	3,1
TP+	9786,67± 776,23 b	76,6	3307,33± 189,38 b	47,1	27,33± 6,43 b	16,2	24,00 ± 7,55 a	26,4
TP-	13916,67 ±711,22 b	62,7	13213,33± 640,10 a	5,8	36,77± 1,78 a	0	20,57 ± 2,23 a	6,5
Inkubacja z wyspecjalizowanym konsorcjum mikroorganizmów DFMC								
MP+	7038,33± 520,73 b	83,1	1009,00± 12,77 c	83,4	722,33± 21,55 b	45,5	90,50 ± 0,50 b	73.1
MP-	6158,33± 596,75 c	83,7	1369,67± 123,96 c	88,9	12,50± 1,32 b	65,2	9,20 ± 0,27 b	63.3
TP+	5378,00± 168,08 c	87,1	806,00± 9,54 c	87,1	8,35± 1,26 c	88,5	5,53 ± 0,92 b	83.0
TP-	7276,67± 241,32 c	80,5	1406,67± 76,43 b	90,0	8,33± 0,65 b	75,2	8,83 ± 1,04 b	59.9

*wydajność usuwania poszczególnych parametrów

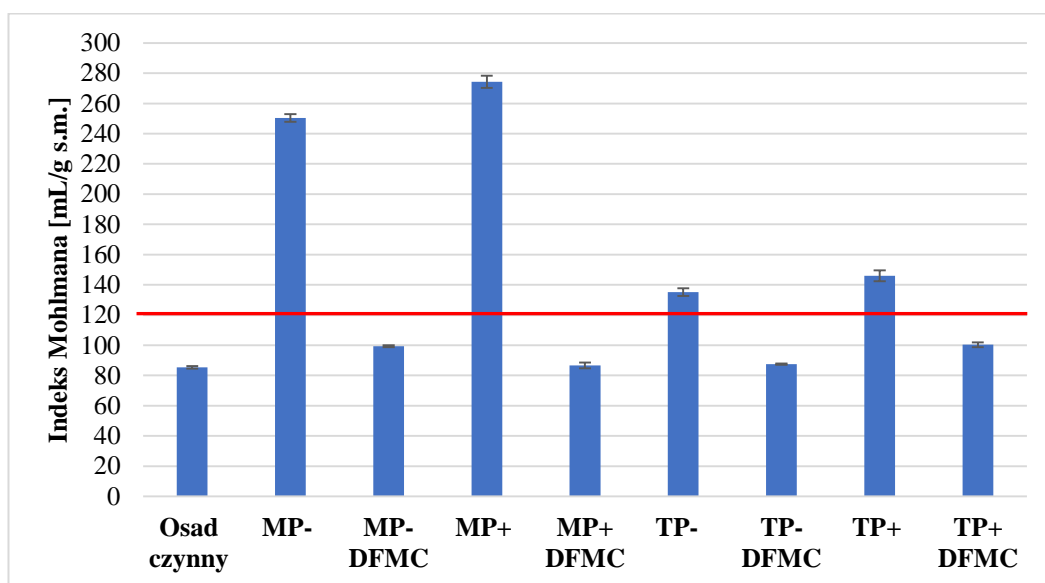
4.4.5.5 Wpływ wstępnie oczyszczonych cieczy pofermentacyjnych na osad czynny biologicznej oczyszczalni ścieków

W celu określenia, czy uzyskana wydajność usuwania zanieczyszczeń podczas etapu wstępnego oczyszczania obniżyła toksyczność odcieków, wykonano testy z osadem czynnym. Wydaje się, że kluczowe znaczenia miało obniżenie zawartości kwasów tłuszczowych, które zgodnie z literaturą są potencjalnym czynnikiem toksyczności. W doświadczeniu, ciecze

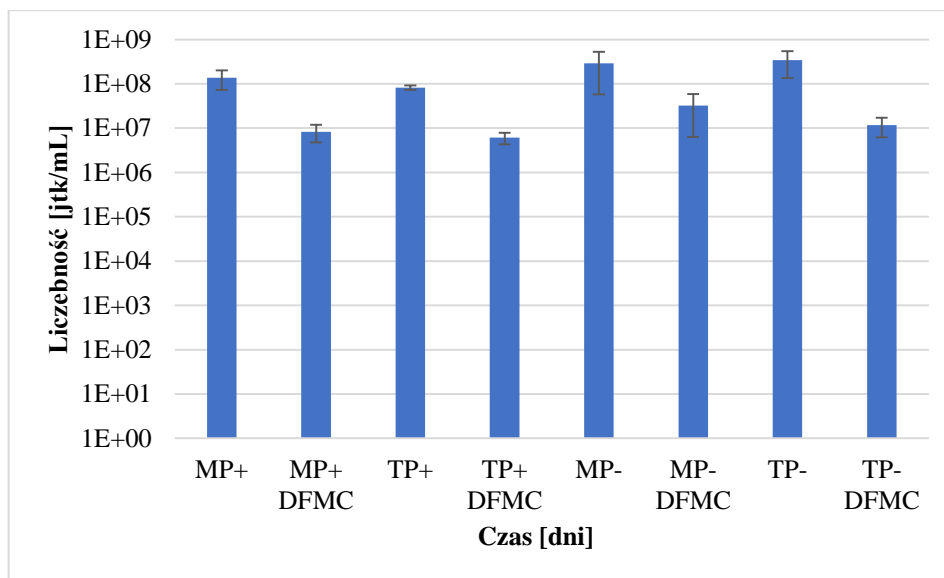
podczyszczone za pomocą konsorcjum DFMC zmieszano w stosunku 4:1 z osadem czynnym i inkubowano z przez okres 7 dni. Jako kontrolę wykorzystano odcieki nietraktowane.

Kondycję osadu czynnego po 7-dniowej inkubacji z odciekami określono poprzez analizę wartości indeksu Mohlmana (ryc. 85), oznaczanie liczebności bakterii wolnożyjących (ryc. 86). Wartości indeksu Mohlmana uzyskane dla odcieków nietraktowanych przekraczały wartość graniczną 120 mL/g s.m., co świadczyło o pęcznieniu osadu. Odcieki uprzednio traktowane konsorcjum DFMC charakteryzowały się Indeksom o podobnej wartości do kontroli i mieściły się w przedziale 80 – 100 mL/g s.m.

Podobnie, w przypadku bakterii wolnożyjących, odcieki nietraktowane charakteryzowały się wynikami znacząco gorszymi niż odcieki oczyszczone wcześniej przy użyciu konsorcjum DFMC. Liczebność bakterii wolnożyjących była każdorazowo wyższa w odciekach surowych niż w odciekach wstępnie oczyszczonych (ryc. 86). Wysoka liczba bakterii wolnożyjących świadczy o rozpadzie kłaczków osadu czynnego czyli jego fragmentacji.



Ryc. 85. Diagram przedstawiający wyniki analiz wartości indeksu Mohlmana SVI dla osadu czynnego rozcieńczonego z wodą (osad czynny : woda, 1:4) oraz z odciekami pofermentacyjnymi w stosunku 1:4. Czerwoną linią zaznaczono krytyczną wartość progową 120 mL/g s.m. Wartości SVI powyżej 120 mL/ g s.m. wskazują na pęcznienie osadu i świadczą o jego złej kondycji

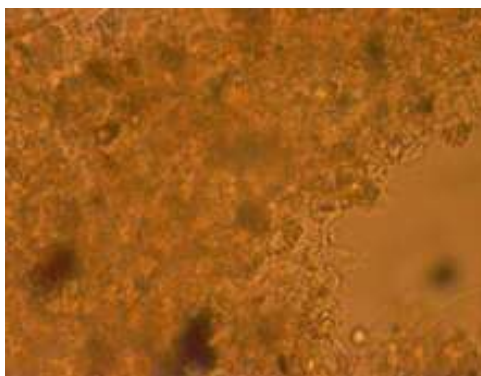


Ryc. 86. Analiza liczebności bakterii wolnożyjących w próbkach odcieków pofermentacyjnych zmieszanych z osadem czynnym w stosunku 1:4. Wyższa liczebność bakterii wolnożyjących w próbkach odcieków nietraktowanych wstępnie konsorcjum mikroorganizmów autochtonicznych DFMC świadczy o gorszej kondycji osadu czynnego (słabsza integracja bakterii z kłaczkami osadu czynnego)

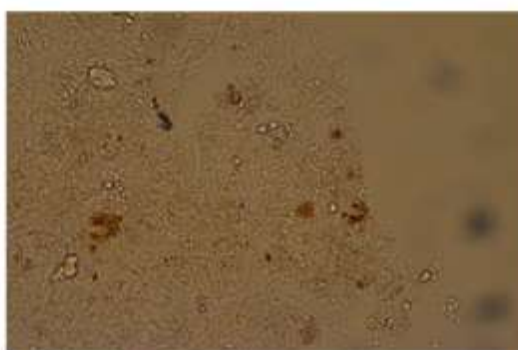
Oceny jakości osadu czynnego dokonano również poprzez obserwację mikroskopową. O dobrej kondycji osadu czynnego świadczą obecność zwartych, mocnych kłaczków oraz niewielka liczebność bakterii wolnożyjących. Obecność orzęsków – organizmów wskaźnikowych, jak również ameb i wrotków to dodatkowe przesłanki wskazujące na prawidłową pracę osadu czynnego.

Oceny mikroskopowej osadu czynnego dokonano przed założeniem eksperymentu, a następnie po 7 dniach inkubacji z poszczególnymi odciekami: surowymi oraz po traktowaniu konsorcjum mikroorganizmów autochtonicznych DFMC. Poniżej zamieszczono zdjęcia poglądowe (ryc. 87 – 90).

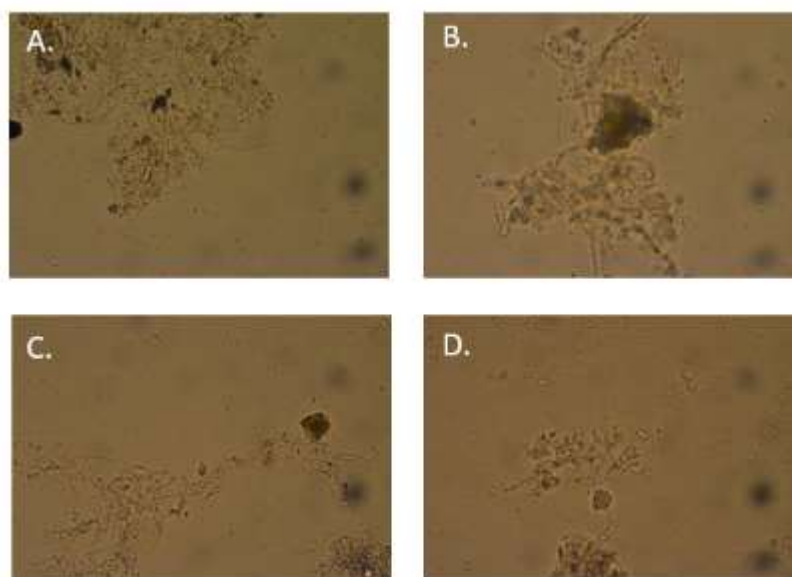
Osad czynny w dniu pobrania charakteryzował się zwartą strukturą i niewielką liczebnością bakterii wolnożyjących (ryc. 87). Po 7-dniowej inkubacji osadu w warunkach napowietrzania struktury kłaczków uległy w nieznacznym stopniu rozluźnieniu, jednakże nie nastąpiła znacząca zmiana wielkości kłaczków (ryc. 88). Podobny obraz uzyskano w przypadku próbek osadu czynnego inkubowanych z odciekami traktowanymi uprzednio konsorcjum DFMC (ryc. 90). W przypadku osadu czynnego poddanego inkubacji z nietraktowanymi odciekami można było z kolei zaobserwować niemal całkowity rozpad struktury kłaczków, wyraźnie było widać zmniejszenie ich średnicy i defragmentację (ryc. 89), co świadczyło o znacząco gorszej kondycji osadu niż w przypadku kontroli i wariantu uprzednio traktowanego konsorcjum DFMC.



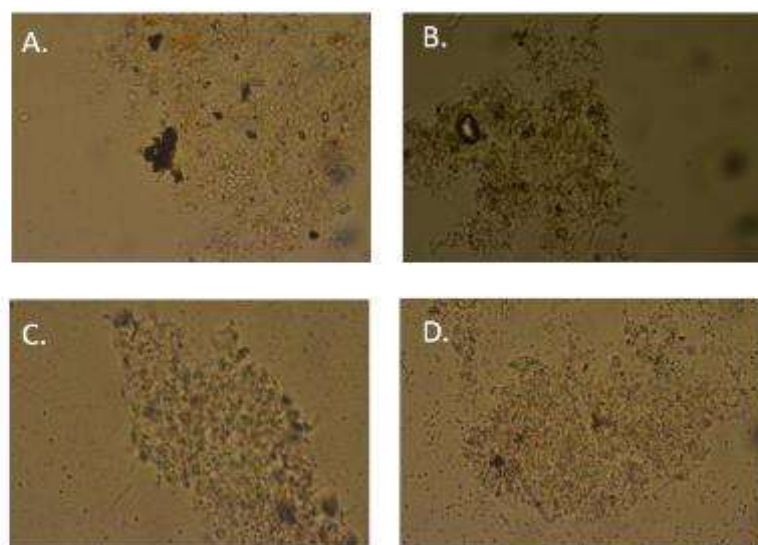
Ryc. 87. Obraz mikroskopowy (pow. 400x) osadu czynnego w dniu pobrania z oczyszczalni ścieków



Ryc. 88. Obraz mikroskopowy (pow. 400x) osadu czynnego po 7 dniach w warunkach napowietrzania – doświadczenie kontrolne



Ryc. 89. A-D. Zdjęcia przedstawiające obrazy mikroskopowe (pow. 400x) osadu czynnego po 7 dniach inkubacji z odciekami surowymi (A – MP+; B – MP-; C - TP+; D – TP-)



Ryc. 90. A-D. Zdjęcia przedstawiające obrazy mikroskopowe (pow. 100x) osadu czynnego po 7 dniach inkubacji z odciekami wstępnie oczyszczanymi za pomocą konsorcjum mikroorganizmów autochtonicznych DFMC (A – MP+; B – MP-; C - TP+; D – TP-)

Konsorcjum DFMC wykazuje potencjał aplikacyjny jako uniwersalny preparat do oczyszczania odcieków pochodzących z procesów fermentacji, szczególnie fermentacji ciemnej i dlatego zostało ono obecnie przekazane do instytucji certyfikującej (Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH – Państwowy Instytut Badawczy) w celu uzyskania certyfikatu higienicznego dopuszczającego możliwość zastosowań środowiskowych – jako szczepionkę mikrobiologiczną (zaszczep) służącą do uruchamiania procesu biologicznego oczyszczania cieczy pofermentacyjnych powstających podczas wytwarzania biowodoru metodą ciemnej fermentacji.

5. Dyskusja

Sektor produkcji biogazu i biowodoru jest niezwykle intensywnie rozwijającą się dziedziną. Realne zagrożenia wynikające ze stosowania paliw kopalnych stawiają nas naprzeciw ważnym decyzjom i działaniom, których celem jest poprawa jakości stosowanych źródeł energii, a przede wszystkim obniżenie negatywnego wpływu metod produkcji energii na środowisko. Rządy poszczególnych krajów już dostosowują swoje prawodawstwo, tak aby wymusić i zakodfikować niezbędne zmiany w przemyśle energetycznym [European Green Deal 2020; Departament Energii USA 2020; Komisja Europejska 2021]. Jednakże, aby uzyskać całkowitą neutralność środowiskową wykorzystywanych źródeł energii, należy w pierwszym rzędzie przedsięwziąć stosowne kroki prowadzące do likwidacji bądź neutralizacji zanieczyszczeń powstających w wyniku procesów fermentacji metanowej i fermentacji ciemnej. Szczególne znaczenie ma w tym kontekście opracowanie skutecznych biotechnologii eliminacji środowiskowego zagrożenia nadmiarem substancji biogennych, a zwłaszcza związkami azotu. Zagadnienie to stanowi wyzwanie w świetle obecnie proponowanych, wciąż mało efektywnych, kosztownych i wymagających doskonalenia metod [Cydzik-Kwiatkowska i Zielińska 2016; Tambone i in. 2017; Cieciora-Włoch i in. 2020].

Celem niniejszej pracy była próba podjęcia problematyki oczyszczania najbardziej uciążliwego odpadu powstającego podczas produkcji biogazu i biowodoru, a mianowicie cieczy pofermentacyjnej – uwodnionej frakcji masy pofermentacyjnej. Jest to odciek poprzemysłowy, silnie obciążony materią organiczną i związkami biogennymi, charakteryzujący się niezwykle zmiennym składem i zazwyczaj wysoką toksycznością wobec drobnoustrojów allochtonicznych i osadu czynnego biologicznych oczyszczalni ścieków. Opisane cechy skutkują licznymi zagrożeniami środowiskowymi, a przede wszystkim ogromnymi trudnościami związanymi ze stosowaniem konwencjonalnych technik oczyszczania.

W części eksperymentalnej pracy badano trzy zestawy cieczy pofermentacyjnych: odcieki pozyskane z trzech przemysłowych instalacji produkcji biogazu oraz cieczy powstające w trakcie fermentacji metanowej i fermentacji ciemnej, wytworzone w laboratoryjnej instalacji modelowej Politechniki Łódzkiej przez grupę kierowaną przez prof. Sebastiana Borowskiego.

Podczas doboru do badań cieczy po fermentacji metanowej, kierowano się pozyskaniem materiału niejednorodnego, pochodzącego z różnych bioprocessów, powstałego w wyniku fermentacji odmiennych substratów. Heterogeniczność cieczy pofermentacyjnych jest szczególnym wyzwaniem z punktu widzenia możliwości ich skutecznej bioremediacji, a wynika z faktu, iż w myśl promowanej idei gospodarki zeroemisyjnej, do produkcji energii odnawialnej wykorzystuje się rozmaite surowce odpadowe, o niejednorodnym i trudnym do przewidzenia składzie, a to z kolei znacząco wpływa na poziom toksyczności i ładunek zanieczyszczeń w cieczach pofermentacyjnych [Cukrowski i Oniszek-Popławska 2010; Keerthana 2022]. W związku z powyższym, analizowane odcieki pochodziły z biometanizacji

surowców pochodzenia roślinnego (wysłodków buraczanych), odzwierzęcego (odpadów poubojowych, pomiotu kurzego, gnojowicy świńskiej), jak również osadów ściekowych.

Z kolei, w badaniach odcieków towarzyszących ciemnej fermentacji należy zwrócić uwagę na fakt, iż produkcja biowodoru, aczkolwiek niezwykle obiecująca, jest wciąż dziedziną stosunkowo nową i niewdrożoną jeszcze w praktykę przemysłową w takim zakresie, jak produkcja biogazu. Dlatego też w pracy korzystano jedynie z odcieków powstałych w instalacji modelowej, w której jako surowiec zastosowano wysłodki buraczane. W tym wypadku testowano ciecze, które różniły się warunkami prowadzenia procesu. Aspekt ten, jak się okazało, również ma znaczący wpływ na skład i poziom zanieczyszczeń oraz toksyczność powstających odcieków pofermentacyjnych [patrz pkt. 4.4].

Schemat zaprezentowany na ryc. 91 przedstawia propozycję możliwych sposobów zagospodarowania cieczy pofermentacyjnych powstających zarówno podczas biometanizacji substratów organicznych, jak i fermentacji wodorowej. Ukazuje zintegrowany system technologiczny produkcji energii odnawialnej wraz z wariantami optymalnych metod eliminacji zagrożeń i usuwania zanieczyszczeń. Został on stworzony w oparciu o dane literaturowe oraz rezultaty badawcze przeprowadzonych testów. Pozawala jednocześnie usystematyzować i zwizualizować sekwencje prac wykonanych w ramach pracy doktorskiej.

Procesy ciemnej fermentacji i biometanizacji są nierzadko ze sobą powiązane [Sivagurunathan i in. 2017]. Odwodniona frakcja odcieku po fermentacji ciemnej może zostać przekierowana jako substrat do fermentacji metanowej. Frakcja ciekła, z kolei, może zostać zawrócona do układu fermentacji ciemnej, jednakże tylko w określonej objętości (nie wyższej niż ok. 20% objętości roboczej fermentora), ponieważ wiąże się to z ryzykiem postępującej kumulacji związków niekorzystnych i toksycznych (substancji biogennych: N, P, S, metali ciężkich), co może negatywnie wpływać na wydajność produkcji biowodoru.

Ocieki zarówno z fermentacji ciemnej, jak i metanowej ostatecznie wymagają odpowiedniego oczyszczania. Ze względu na obserwowaną często wysoką toksyczność tych odpadów i obciążenie związkami biogennymi, nie mogą one trafiać bezpośrednio do oczyszczalni ścieków [Kasprzycka 2011]. W przeprowadzonych i udokumentowanych w pracy doświadczeniach badano i optymalizowano szereg różnorodnych metod biologicznego oczyszczania, mających na celu wypracowanie i zaproponowanie do wdrożenia systemowych rozwiązań unieszkodliwiania odcieków pofermentacyjnych, zarówno poprzez zmniejszenie poziomu zanieczyszczeń, jak i obniżenie ekotoksyczności. Należy podkreślić, że dotychczas wiele z zastosowanych podejść badawczych jest całkiem nowych i nie zostało jeszcze udokumentowane w źródłach literaturowych i patentowych.

W pracy wykazano między innymi po raz pierwszy, że wybrane, reprezentatywne próbki odcieków pofermentacyjnych, mogły być oczyszczane z wykorzystaniem monokultur drożdżowych specjalistycznych drożdży, a uzyskane wydajności bioremediacji były równe najlepszym rozwiązaniom stosującym konsorcja bakteryjne. Wykazano także zdolność jednokomórkowych eukariotycznych alg do bytowania w środowisku wysoce toksycznych i eutrofizowanych odcieków oraz skuteczność tych fotosyntetyzujących mikroorganizmów w

neutralizacji czynników toksycznych. Testowano również inne podejścia angażujące drobnoustroje autochtoniczne i allochtoniczne oraz ich konsorcja.

Wyniki uzyskane w ramach przedstawionej pracy doktorskiej przyczyniły się do określenia czynników toksycznych znajdujących się w cieczach powstałych po produkcji biogazu i biowodoru oraz do opracowania skutecznych metod ich usuwania. Wykazano, że ciecze pofermentacyjne charakteryzują się wysokim poziomem zmienności zależnym między innymi od substratu użytego do fermentacji. W badaniach analitycznych wyznaczono wybrane parametry definiujące obserwowaną wysoką zmienność.

Wspólną cechą odcieków powstałych w wyniku produkcji biogazu był wysoki poziom azotu, występującego głównie w formie amonowej (pomiędzy ok. 1000 a 3000 mg/L) oraz niski stosunek C:N. Testowane drobnoustroje allochtoniczne w wielu przypadkach nie były zdolne do utrzymania początkowo oznaczanej liczebności w środowisku odcieku podczas wydłużonej inkubacji, co stanowiło wyzwanie przy projektowaniu metod oczyszczania tych ścieków. Zaangażowanie na różnych etapach odmiennych grup drobnoustrojów, a także ich mieszanych biocenozy okazało się skutecznym podejściem do problemu oczyszczania cieczy pofermentacyjnych. Zastosowane konsorcja bakteryjne i bakteryjno-drożdżowe oraz bakteryjno-algowe usunęły między 50 a 80% początkowej zawartości poszczególnych substancji toksycznych znajdujących się w odciekach.

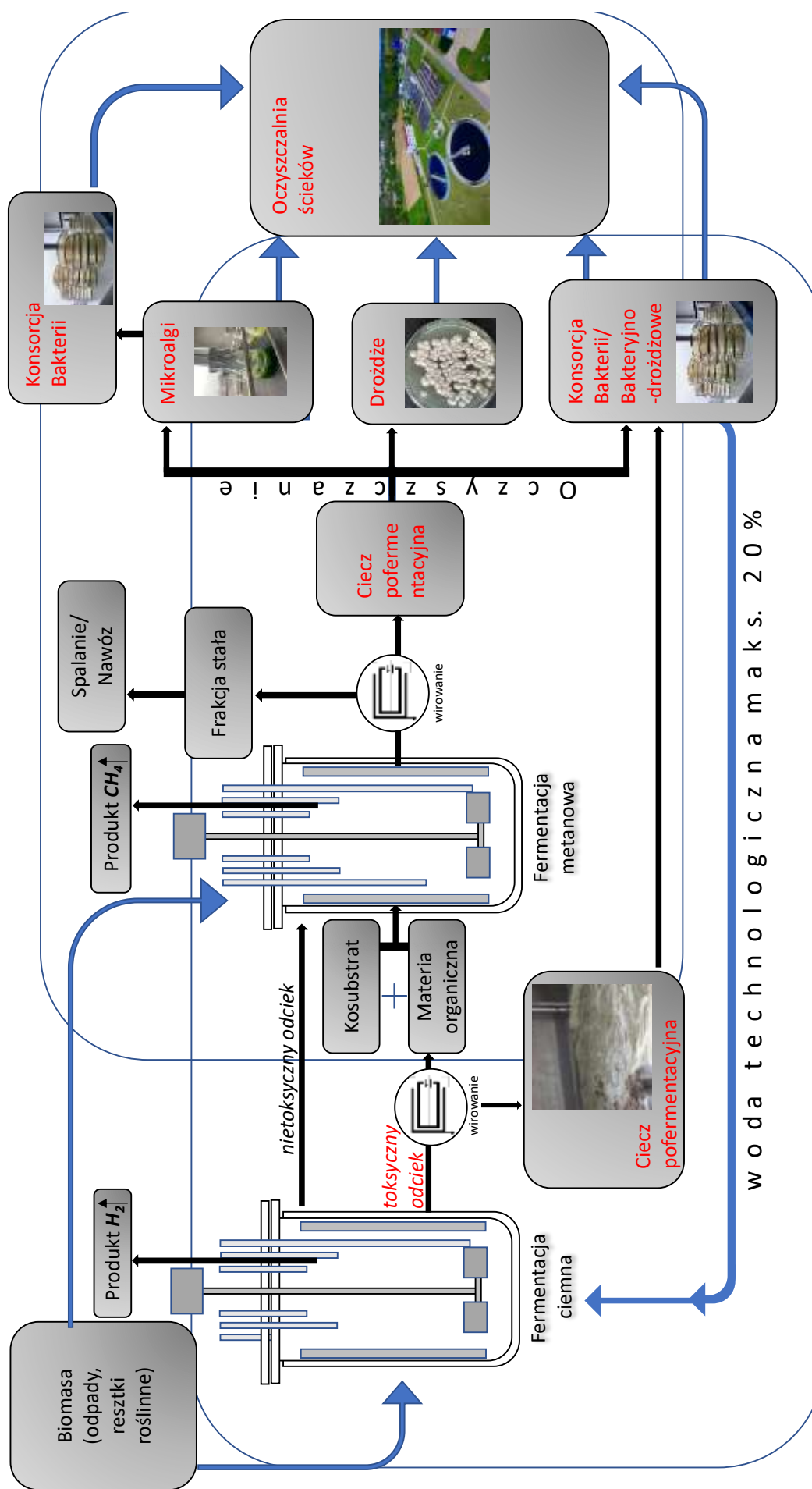
Ocieki powstałe podczas fermentacji ciemniej wysłodków, w odróżnieniu od typowych cieczy pofermentacyjnych z procesu biometanizacji charakteryzowały się wysokim poziomem materii organicznej (ChZT ok. 40 000 mg O₂/L) oraz, w niektórych przypadkach, wysoką zawartością fosforu, sięgającą nawet do 1400 mg/L. W skład materii organicznej w dużej mierze wchodziły kwasy organiczne, których toksyczność została wielokrotnie wykazana w opublikowanych pracach [Tenuta i in. 2002; Zeb i in. 2014; Ciecziura-Włoch i in. 2021]. Testy przeżywalności wybranych mikroorganizmów pro- i eukariotycznych oraz osadu czynnego w środowisku omawianych odcieków wykazały wysoki poziom toksyczności. Mikrobiota autochtoniczna wyizolowana z odcieków, po namnożeniu do wysokich liczebności w warunkach laboratoryjnych i po ponownym zaszczepieniu, była zdolna do usunięcia toksycznych związków i wpływała na obniżenie poziomu toksyczności wobec osadu czynnego.

Poniżej, w kolejnych punktach poddano szczegółowej dyskusji wyniki przeprowadzonych badań. W świetle dokonanego przeglądu literatury przedmiotu wydaje się uzasadnione stwierdzić, że rezultaty przedstawionych prac są innowacyjne i mają wysoki potencjał aplikacyjny. Na dowód tego poglądu należy wspomnieć, iż opracowane w ramach przeprowadzonych prac badawczych uniwersalne konsorcjum drobnoustrojów zdolnych do oczyszczania cieczy po fermentacji ciemnej jest obecnie w trakcie certyfikacji prowadzącej do uzyskania atestu Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego PZH – Państwowego Instytutu Badawczego. Konsorcjum to, po atestacji będzie mogło być wykorzystane jako biopreparat ukierunkowany na inicjację procesu biooczyszczania z przeznaczeniem do zastosowania w ściekach wysokoobciążonych materią organiczną i związkami biogennymi, przede wszystkim w cieczach powstałych po produkcji biowodoru.

1. Ustalenie zmienności składu oraz obciążenia cieczy pofermentacyjnych

Badane ciecze powstałe w wyniku produkcji biogazu na drodze fermentacji wykazywały się wysoką heterogenicznością składu. Zmienność ta w dużej mierze zależna była od substratu użytego do biometanizacji (tab. 10), co jest zgodne z opublikowanymi danymi [Podkówka i in. 2012]. Największe różnice zaobserwowano w przypadku obciążenia materia organiczną mierzonego parametrem ChZT, poziom chemicznego zapotrzebowania tlenu, którego wartość wahała się między 390 mg O₂/mL (odciek KK po fermentacji osadów ściekowych) a 18435 mg O₂/mL (odciek B po fermentacji ścieków poubojowych). Jak wiadomo, oznaczone wartości ChZT korelują, dla danego typu ścieków, z zawartością OWO (ogólnego węgla organicznego) [Miksch. i in. 2010], czyli z obecnością przyswajalnych związków węgla. Należy jednak zwrócić uwagę, że chemiczne zapotrzebowanie tlenu, które jest miarą utlenialności zanieczyszczeń w ściekach, odzwierciedla również obecność innych – obok węgla – zredukowanych związków organicznych, a także niektórych soli mineralnych [Dymaczewski 1995].

Wszystkie analizowane ciecze pofermentacyjne z procesu biometanizacji charakteryzowały się wysoką zawartością azotu amonowego (odciek A: 1194,5 mg/L, odciek B: 1810 mg/L, odciek C+D: 992,5 mg/L, odciek E: 3110 mg/mL, odciek BSZ: 2554 mg/L, odciek BB: 1075g/dm³ oraz odciek KK: 986 mg/L), którego wartość znacznie przekraczała normy określone stosownymi rozporządzeniami, a ich wprowadzenie do środowiska wiązałoby się z wysokim zagrożeniem eutrofizacją okolicznych zbiorników wodnych [Rozporządzenie Ministra Gospodarki Morskiej i Żeglugi 2019]. Niekorzystny stosunek węgla do azotu w większości badanych odcieków sprawiał, że ich oczyszczanie dostępnymi metodami konwencjonalnymi (np. osadem czynnym) było niezwykle utrudnione i stanowiło szczególne wyzwanie badawcze.



Ryc. 91. Schemat przedstawiający etapy zagospodarowania masy pofermentacyjnej [opracowanie własne]

Ciecze powstałe jako produkt uboczny produkcji biowodoru podczas fermentacji ciemnej również charakteryzowały się zmiennością parametrów fizyko-chemicznych. Badaniom poddano cztery ciecze pofermentacyjne różniące się warunkami prowadzenia procesu (fermentacja mezofilna: MP- i MP+ oraz termofilna: TP- i TP+). Największym poziomem zmienności, w przypadku tego typu odpadów, charakteryzowała się zawartość fosforu, mieszcząca się w zakresie od 33,53 mg/L dla TP- do 1325,77 mg/L dla MP+), oraz azotu, w zakresie 22 mg/L dla TP- do 336,33 mg/L dla MP+). Pomimo podobnego poziomu ChZT we wszystkich badanych odciekach (tab. 30), stwierdzono jednocześnie duże zróżnicowanie zawartości kwasów organicznych, które są jednym z głównych czynników toksyczności. Poziom oznaczonych lotnych kwasów organicznych w przeliczeniu na kwas octowy, wahał się pomiędzy 6066,67 mg/L (odciek MP+) a 14 034 mg/L (odciek TP-).

Wskazane powyżej wyniki jednoznacznie pokazują, iż odcieki pofermentacyjne są niejednorodne oraz silnie zależne od substratu użytego do fermentacji, a także od warunków prowadzenia procesu.

2. Występowanie i identyfikacja drobnoustrojów autochtonicznych w odciekach pofermentacyjnych

Badane odcieki po biometanizacji wykazywały dużą zmienność pod względem kolonizacji przez mikrobiotę autochtoniczną. Odcieki BB i KK, cechujące się wyjątkowo niskim poziomem węgla w stosunku do azotu, charakteryzowały się jednocześnie mało liczną populacją bakterii o niewielkiej różnorodności gatunkowej (BB: $2,1 \cdot 10^5$ jtk/mL; KK: $1,6 \cdot 10^5$ jtk/mL, głównie Gram-ujemne pałeczki). Pozostałe odcieki po fermentacji metanowej, z kolei, ze względu na wyższą dostępność przyswajalnego węgla zawierały ponad 100-krotnie więcej bakterii o różnorodnym składzie (między $1 \cdot 10^7$ jtk/mL a $5 \cdot 10^7$ jtk/mL).

W przypadku odcieków po fermentacji wodorowej czynnikiem limitującym rozwój licznej mikrobioty autochtonicznej okazał się fosfor i azot. Wysoka zawartość tych biogenów w odcieku MP+ korelowała z niską liczebnością drobnoustrojów równą $1,04 \cdot 10^5$ jtk/mL (tab. 30). W pozostałych odciekach liczebność autochtonów była rzędu 10^7 jtk/mL.

Przeprowadzone doświadczenia oczyszczania poszczególnych odcieków (zarówno po biometanizacji, jak i fermentacji wodorowej) z wykorzystaniem drobnoustrojów autochtonicznych wskazały na potencjał autochtonów w usuwaniu związków biogenych i materii organicznej. Jednakże, niejednokrotnie efektywność oczyszczania była niewystarczająca, co stanowiło podstawę przedsięwzięcia odpowiednich działań niezbędnych do intensyfikacji procesów bioremediacji.

3. Toksyczność odcieków pofermentacyjnych wobec wybranych drobnoustrojów allochtonicznych oraz konsorcjów mikrobiologicznych

Przeznaczone do analiz toksyczności drobnoustroje zostały we wcześniejszych pracach wyizolowane ze środowiska i posłużyły jako organizmy wskaźnikowe, ich tolerancja, określana jako przeżywalność, miała świadczyć o neutralnym wpływie odcieku na mikrobiotę środowiskową. Testowano ponadto bakterie zoogloalne wchodzące w skład osadu czynnego (*Zoogloea ramigera*), jak również kompletną biocenozę osadu czynnego pobranego z komory napowietrzania przykładowej, reprezentatywnej oczyszczalni ścieków komunalnych (COŚ w Krzeszowicach) w celu określenia możliwości wprowadzenia surowych odcieków do systemu oczyszczania ścieków miejskich.

Przeprowadzone testy toksyczności odcieków po fermentacji metanowej względem wybranych drobnoustrojów: monokultur bakterii (*Pseudomonas* sp. 18 i *Zoogloea ramigera*), konsorcjów mikrobiologicznych (konsorcjum SB i biopreparat ZB-01) oraz szczepów drożdży konwencjonalnych (*Saccharomyces cerevisiae*) i niekonwencjonalnych (*Candida* sp. D11, *Hansenula polymorpha*, *Trichosporon* sp., *Yarrowia lipolytica*), wykazały, że odcieki charakteryzowały się zróżnicowanym poziomem toksyczności. Wszystkie odcieki modelowe A, B, C+D i E wykazały silną toksyczność względem drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i *Hansenula polymorpha*, ale stopień toksyczności był najwyższy dla odcieku B i C+D (całkowity spadek liczebności w pierwszej dobie inkubacji). W przypadku odcieków A i E spadek liczebności następował kolejno po pierwszej i po trzeciej dobie. Drożdże *Candida* sp. w każdym odcieku traciły całkowitą przeżywalność między 4 a 7 dobą inkubacji, a drożdże *Trichosporon* sp. przeżywały przez cały okres inkubacji w odciekach A i C+D, z kolei w odciekach B i E ginęły między 4 a 7 dobą (ryc. 20 – 35). Wszystkie odcieki nie wykazywały efektu toksycznego względem biocenozy ZB-01 (ryc. 18).

Zaskakujące okazały się wyniki doświadczeń przeprowadzonych z użyciem odcieków BB i KK, pochodzących z instalacji biogazowni przemysłowych, kolejno w Bielsku Białej i w Krzeszowicach. W obu przypadkach do procesu fermentacji, jako substratu użyto osadów ściekowych, a ten sam rodzaj substratu znalazł odzwierciedlenie w wartościach oznaczonych poszczególnych parametrów (podobny stosunek C:N, dla BB – 0,45; KK – 0,4). Jednakże, badane ciecze charakteryzowały się odmiennym poziomem toksyczności. Znacząco bardziej toksyczny okazał się odciek BB. Wśród badanych drobnoustrojów jedynie drożdże *Trichosporon* sp. i biocenoza ZB-01 utrzymały początkową liczebność w odcieku BB przez okres 7 dni (ryc. 38 – 45). Odciek KK nie wykazał z kolei toksyczności względem bakterii *Pseudomonas* sp., bakterii *Zoogloea ramigera*, drożdży *Trichosporon* sp. oraz konsorcjów SB i ZB-01 (ryc. 57 – 65). Świadczy to o dodatkowym aspekcie powiązanim ze zmiennością tego typu odpadów, który może być związany z różnicami w prowadzeniu procesów (np. dodatek chemicznych koagulantów), bądź obecnością innych trudnoznaczalnych, toksycznych związków. Identyfikacja czynników toksyczności w tego typu odpadach niejednokrotnie jest trudna, a czasami wręcz niemożliwa.

W przypadku testów toksyczności odcieków po fermentacji wodorowej (MP+, MP-, TP+, TP-), stwierdzono znacznie większe zagrożenia środowiskowe manifestujące się

negatywnym wpływem na drobnoustroje wszystkich badanych próbek. Toksyczność odcieków wobec wybranych bakterii (*Pseudomonas* sp. 18, *Zoogloea ramigera*) i konsorcjów bakterii allochtonicznych (ZB-01, SB) była wysoka, co wskazywało na brak możliwości wprowadzenia cieczy bezpośrednio do gleby (toksyczność względem powszechnie występujących bakterii glebowych: *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Rhizobium* sp.), jak również do komór oczyszczalni ścieków (silna toksyczność względem *Zoogloea ramigera* oraz osadu czynnego pobranego z oczyszczalni miejskiej). Znacząca redukcja liczebności bakterii występowała już w pierwszej dobie (odciek TP+) oraz pomiędzy drugą a czwartą dobą inkubacji (odcieki MP+, MP- i TP-).

Najistotniejsze różnice zaobserwowano w przypadku toksyczności względem wybranych drożdży (*Candida* sp. D11, *Hansenula polymorpha*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon* sp., *Yarrowia lipolytica*). W wyniku przeprowadzonych doświadczeń zaobserwowano brak toksyczności odcieku MP- i TP- względem wszystkich badanych szczepów drożdżowych. Odciek TP+ nie wpływał negatywnie na liczebność jedynie szczepu *Saccharomyces cerevisiae*, a odciek MP+ z kolei nie był toksyczny względem drożdży *Yarrowia lipolytica* (ryc. 75 – 79).

Przedstawione powyżej doświadczenia jednoznacznie wskazują, że ciecze pofermentacyjne wykazują zróżnicowaną, niejednokrotnie bardzo wszechstronną i wysoką toksyczność względem drobnoustrojów allochtonicznych. Odpad ten zatem stanowi poważne niebezpieczeństwo dla środowiska i konieczne jest jego odpowiednie zagospodarowanie.

4. Dobór aktywnych drobnoustrojów w celu konstrukcji bioróżnorodnych konsorcjów mikrobiologicznych zdolnych do usuwania biogenów i efektywnej bioremediacji zanieczyszczeń w potencjalnie toksycznych cieczach pofermentacyjnych

Wyzwaniem jest opracowanie skutecznych metod oczyszczania cieczy pofermentacyjnych. Istniejące rozwiązania wciąż są niedoskonałe (niska skuteczność, wysokie koszty). Opracowanie wydajnej biotechnologii eliminacji problemu ponadnormatywnych poziomów związków biogenych pozwoliłoby na wprowadzanie odcieków do systemu oczyszczalni ścieków, a także stworzenie dodatkowej możliwości recykulacji podczyszczonego odcieku jako wody technologicznej, nie powodując przy tym ryzyka tzw. zatężania ścieków [Jędrzak 2008].

Ze względu na udowodnioną wysoką zmienność właściwości i toksyczności odcieków, zastosowano zindywidualizowane podejścia do ich oczyszczania. W planowaniu koncepcji i przebiegu poszczególnych doświadczeń laboratoryjnych kierowano się poziomem toksyczności oraz stosunkiem C:N. Wykorzystanie wybranych drobnoustrojów prokariotycznych i eukariotycznych, a także ich bioróżnorodnych konsorcjów, spowodowało usunięcie znaczących ilości związków biogenych (azotu i fosforu), jednych z głównych zanieczyszczeń odcieków po fermentacji metanowej i wodorowej, potencjalnie odpowiedzialnych za eutrofizację wód i gleb. Przyczyniły się również do istotnej redukcji

poziomu materii organicznej, w tym kwasów organicznych (w przypadku odcieków po fermentacji wodorowej).

W przypadku modelowych **odcieków A, B, C+D i E**, najbardziej efektywne w bioremediacji zanieczyszczeń okazało się konsorcjum ZB-01, którego zastosowanie doprowadziło do redukcji zawartości azotu amonowego kolejno o 80% (odciek A), 54% (odciek B), 94% (odciek C+D) i 83% (odciek E). Biopreparat ZB-01 to wyspecjalizowana biocenoza bakteryjna, składająca się z mikroorganizmów wyizolowanych ze środowisk silnie zanieczyszczonych antropogenicznie ksenobiotykami. Sprawia to, że jej wykorzystanie i potwierdzone działanie oczyszczania odcieków pofermentacyjnych jest w pełni uzasadnione.

Kolejnym, zastosowanym w doświadczeniach, konsorcjum bakteryjnym była biocenoza amonofilnych bakterii BLL, którą bioagumentowano **odciek BSZ**, charakteryzujący się wysokim poziomem azotu amonowego oraz materii organicznej wyrażonej jako ChZT (tab. 19). Po 14 dniach trwania procesu oczyszczania, wydajność usuwania azotu amonowego była równa 88,5%, a jednocześnie nastąpił 53-proc. spadek ChZT i znaczący wzrost (ponad czterokrotny) gęstości aktywnej biocenozy. Biocenoza BLL jest zatem postulowana jako konsorcjum preadaptowanych i wyspecjalizowanych mikroorganizmów, mogąca posłużyć do wytworzenia osadu czynnego, który przeznaczony będzie do biologicznego oczyszczania cieczy pofermentacyjnych zawierających duże ilości związków azotu.

Z racji faktu, iż **odciek BB**, jako typowy, toksyczny ściek wytworzony w warunkach przemysłowych, powstały po biometanizacji osadów ściekowych, może być uznany jako reprezentatywny dla tej kategorii cieczy pofermentacyjnych, jego oczyszczaniu poświęcono kilkietapowy cykl badawczy.

Odciek BB charakteryzował się wysokim poziomem toksyczności względem badanych drobnoustrojów. Jednakże niektóre z drożdży (*Trichosporon* sp. i *Candida* sp. D11) wykazały tolerancję i zdolność do utrzymania wysokiej liczebności podczas inkubacji. Takie szczepy wykorzystano jako składniki wspomagające biocenozę bakteryjną ZB-01 i przeznaczono do oczyszczania cieczy pofermentacyjnych.

Zastosowanie samej biocenozy drobnoustrojów ZB-01, pozwoliło na 46-procentową deamonifikację, nie prowadząc równoległe do zwiększenia zawartości azotu azotanowego. Konstrukcja mieszanych konsorcjów bakteryjno – drożdżowych nie przyniosła, z kolei, oczekiwanego efektu wzrostu wydajności usuwania azotu amonowego.

Na podstawie uzyskanych wyników można zatem stwierdzić, iż dodatek szczepów drożdżowych nie wywołał efektu synergii pomiędzy drobnoustrojami znajdującymi się w powstałym konsorcjum mieszanym. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń sugerują wręcz korzyści, jakie wiążą się z zastosowaniem wyłącznie preparatu bakteryjnego ZB-01 jako najbardziej skutecznej biocenozy drobnoustrojów w badanym przypadku. Jednakże, można rozważyć wykorzystanie drożdży jako komponentu wspomagającego rozwój biomasy w stosunku do takich pofermentów, które są wyjątkowo ubogie w substancje troficzne, bądź

wykazują właściwości hamujące lub nawet toksyczne dla bakterii. Badania takie wykraczają poza plan badawczy niniejszej pracy i są planowane jako kolejne etapy testów optymalizacyjnych oczyszczania cieczy pofermentacyjnych.

Wysoka toksyczność odcieku BB względem bakterii z gatunku *Zoogloea ramigera* oraz bakterii osadu czynnego świadczyła o konieczności przedsięwzięcia działań mających na celu zmianę jego parametrów fizyko-chemicznych tak, aby jego wprowadzenie do komór napowietrzania biologicznej oczyszczalni ścieków nie zaburzało prawidłowej pracy instalacji.

W celu intensyfikacji procesów oczyszczania i obniżenia toksyczności, jaką charakteryzował się odciek BB, zdecydowano się na wykorzystanie organizmów fotoautotroficznych – mikroalg, dla proliferacji których, jak założono, zaburzony stosunek C:N nie powinien być czynnikiem limitującym. To obiecujące rozwiązanie stanowi przedmiot wielu niezależnych publikacji [Mun i in. 2006; Luo i in. 2014; Zhu i in. 2023].

Zastosowanie bakteryjno-algowego konsorcjum ZTT i szczepu *Chlorella sorokiniana* w oczyszczaniu odcieku BB, poskutkowało znacznym spadkiem toksyczności wobec badanych drobnoustrojów i osadu czynnego. Wartość indeksu Mohlmana (SVI) określająca właściwości sedymentacyjne osadu wzrosła z 67,16 mL/g s.m. do 85 mL/g s.m. Parametr SVI dla osadu czynnego dobrze pracującego mieści się w granicach 80 – 120 mL/g s.m., zatem odciek BB po traktowaniu mikroalgami nie wpłynął negatywnie na kondycję osadu, w przeciwieństwie do odcieku surowego, który powodował degradację struktury kłaczków, wzrost liczebności bakterii wolnopływających i obniżenie wartości indeksu osadowego. W obliczu faktu, że bioaugmentacja mikroalgami przyniosła oczekiwany efekt neutralizacji czynników toksyczności w odcieku BB, odpad ten po wstępnym traktowaniu poddano dalszemu oczyszczaniu z wykorzystaniem osadu czynnego.

W wyniku 7-dniowej inkubacji odcieku BB z osadem czynnym uzyskano spadek zawartości związków azotu: amonowego o 70,5% i azotanowego o 37,5%. Obniżyła się też wartość chemicznego zapotrzebowania tlenu (o 38%, tab. 24). Uzyskany wynik jest najlepszy pod względem wydajności usuwania zanieczyszczeń w przeprowadzonym cyklu badawczym, co świadczy o wysokim potencjale metody zakładającej dwuetapowe traktowanie odcieku kolejno drobnoustrojami fotoautotroficznymi i osadem czynnym.

Odciek KK, charakteryzujący się podobnymi do cieczy BB parametrami, wykazywał niższy stopień toksyczności względem drobnoustrojów allochtonicznych, a zatem nie wymagał wstępnego oczyszczania. Zidentyfikowane w odcieku KK drobnoustroje autochtoniczne nie były jednakże zdolne do wydajnego usunięcia azotu amonowego i wynik obniżenia zawartości tego biogenu o 37% (tab. 28) należy uznać za niewystarczający.

Z racji tego, iż istnieją doniesienia na temat zdolności drożdży z rodzaju *Trichosporon* do asymilacji azotu amonowego [Johnson 1975; Walker 1998], co pokrywa się również z wynikami doświadczeń własnych (*Trichosporon* jako jedyny szczep drożdżowy był zdolny do przeżycia w środowisku odcieku przez okres 7 dni), postanowiono wykorzystać ten szczep do dalszych działań. Inkubacja odcieku KK z drożdżami nie przyniosła jednak oczekiwanego

efektu w postaci znaczącej redukcji zawartości azotu amonowego (spadek jedynie o 14% w ciągu 14 dniowej inkubacji).

W celu usprawnienia procesu biologicznego oczyszczania odcieku KK, charakteryzującego się bardzo niską zawartością węgla organicznego, niezbędne okazało się więc suplementowanie dodatkowym źródłem węgla. Zabieg ten pozwolił na zmianę niekorzystnych, początkowych proporcji C:N, dzięki czemu odciek stał się optymalnym środowiskiem do wzrostu drobnoustrojów. Co więcej nieprawidłowy stosunek C:N hamuje procesy przemian azotu [Sharma i Bhatii 2022].

Odciek KK po suplementacji różnymi źródłami węgla inkubowano z drożdżami *Trichosporon* sp. przez okres 14 dni. We wszystkich próbkach, które poddano suplementacji, poziom azotu amonowego obniżył się co najmniej o 50%. Najwyższą wydajność usuwania $\text{NH}_4 - \text{N}$, tj. o 87%, uzyskano w odcieku suplementowanym octanem sodu.

Uzyskane wyniki pozwalają wnioskować, iż drożdże z rodzaju *Trichosporon* sp. były zdolne do efektywnego usuwania azotu amonowego z odcieków pofermentacyjnych. Jednakże w przypadku wyjątkowo niskich stosunków C:N należy rozważyć suplementację zewnętrznym źródłem węgla. Doprowadzanie do proporcji C:N, takich które są optymalne dla namnażania mikroorganizmów, powoduje zwiększoną asymilację tej formy azotu, co jest możliwe dzięki unikatowym właściwościom biochemicznym tych drożdży.

Odcieki MP+, MP-, TP+, TP- powstałe podczas produkcji biowodoru odznaczały się szczególnie heterogenicznym składem, skutkującym zróżnicowanym poziomem toksyczności, która – jak wykazano – zależała również od zmiennych warunków prowadzenia procesu (temperatura, suplementacja fosforem, zmienność w składzie inokulum). Konieczne jest zatem opracowanie uniwersalnych, odtwarzalnych metod zagospodarowania odcieków po fermentacji wodorowej, uwzględniających ich wysoki poziom zmienności. Należy podkreślić, że jak dotąd brak jest dostępnych, udokumentowanych w piśmiennictwie naukowym danych przedstawiających systematyczne badania nad odciekami różnych typów towarzyszących ciemnej fermentacji.

Odciek MP+ charakteryzował się wyjątkowo wysokim poziomem fosforu (1152 mg/L), azotu (336,33 mg/L) i materii organicznej (41760 mg O_2/L). Podczas 7-dniowej inkubacji z hodowlami drożdży wykazano jego silny efekt toksyczny. Jedyne zdolne do przetrwania w środowisku odcieku były drożdże z rodzaju *Yarrowia lipolytica*.

Wyniki testów fosforu i poziomu ChZT wykazały, że w wyniku inkubacji odcieku MP+ z drożdżami *Yarrowia lipolytica* uzyskano wysoką wydajność redukcji wyżej wymienionych parametrów. Zastosowane drożdże przyczyniły się do obniżenia początkowego poziomu ChZT o 73% (z 41709,33 mg O_2/L do 11 600 mg O_2/L) oraz usunięcia 47% początkowej zawartości fosforu (z 1325,77 mg/L do 739,3 mg/L).

Yarrowia lipolytica, drożdże charakteryzujące się unikatowym metabolizmem lipidów i tłuszczów [Beopoulos A. 2008], są odpowiednim kandydatem do potencjalnego

zastosowania do biologicznego oczyszczania uciążliwych ścieków powstających podczas mezofilnej ciemnej fermentacji.

Oczyszczanie odcieków MP+, TP+, MP- i TP- z wykorzystaniem endogennej, autochtonicznej mikrobioty było relatywnie mało wydajne. Zawartość związków toksycznych nie spadała istotnie bądź obniżała się niewystarczająco, aby odciek stał się nietoksyczny względem osadu czynnego (tab. 34).

Wyosobnienie, namnożenie w optymalnym, bogatym podłożu wzrostowym i wzajemna integracja hodowli pojedynczych szczepów mikroorganizmów pochodzących z poszczególnych odcieków, pozwoliło na wytworzenie funkcjonalnego konsorcjum mikroorganizmów DFMC, które znacząco obniżyło poziom wszystkich badanych parametrów (tab. 34). Wysoki stopień redukcji zawartości kwasów tłuszczowych (między 83,4 – 90%) – głównego czynnika toksyczności odcieków – pozwolił na zmniejszenie toksyczności cieczy pofermentacyjnych.

Wyniki analiz przeprowadzonych z wykorzystaniem osadu czynnego inkubowanego z odciekami surowymi i wstępnie oczyszczonymi jednoznacznie wskazują, że ciecze po fermentacji ciemnej, poddane uprzedniej remediacji z wykorzystaniem konsorcjum DFMC mikroorganizmów autochtonicznych, nie były toksyczne dla osadu czynnego. Ocieki po wstępnym oczyszczeniu nadają się więc do skierowania do grupowej, biologicznej oczyszczalni ścieków, nie stwarzając zagrożenia wobec osadu czynnego oraz wykazując radykalnie obniżone parametry zanieczyszczeń.

6. Wnioski – weryfikacja postawionych hipotez

1. Ciecze pofermentacyjne powstałe w wyniku produkcji biogazu (fermentacji metanowej) są wysokoobciążone związkami biogennymi, w szczególności azotem amonowym.
2. Ciecze pofermentacyjne powstałe w procesie fermentacji ciemnej zawierają dużą ilość materii organicznej, w dużej mierze w postaci lotnych kwasów tłuszczowych oraz mogą zawierać wysokie stężenia fosforu, w zależności od warunków prowadzenia bioprocessu.
3. Ciecze pofermentacyjne wykazują dużą zmienność składu, właściwości fizykochemicznych oraz ekotoksyczności; ich heterogeniczność zależy głównie od użytych w procesie fermentacji surowców i metod uzdatniania.
4. Ciecze pofermentacyjne charakteryzują się wysoką toksycznością wobec większości mikroorganizmów allochtonicznych i osadu czynnego.
5. Drobnoustroje autochtoniczne przejawiają własności fizjologiczne i cechy biochemiczne świadczące o ich wysokim potencjale zastosowania do usuwania związków biogennych i materii organicznej z cieczy pofermentacyjnych.
6. Istnieją mikroorganizmy allochtoniczne zdolne do przetrwania w środowisku wysokoobciążonych cieczy pofermentacyjnych. Można je wyselekcjonować stosując odpowiednio dobrane i optymalizowane techniki doboru szczepów i ich adaptacji do niekorzystnego środowiska odcieków. Drobnoustroje takie wykazują również zdolność do usuwania związków toksycznych znajdujących się w cieczach pofermentacyjnych.
7. Mieszane konsorcja mikroorganizmów pro- i eukariotycznych mogą efektywniej usuwać związki toksyczne zawarte w cieczach pofermentacyjnych w porównaniu z hodowlami szczepów działających pojedynczo.
8. Zastosowanie wstępnego oczyszczania z wykorzystaniem jednokomórkowych glonów fotoautotroficznych zmniejsza toksyczność odcieków pofermentacyjnych o niekorzystnym, niskim stosunku C:N i umożliwia ich późniejsze oczyszczanie z wykorzystaniem drobnoustrojów heterotroficznych, w tym osadów czynnych oczyszczalni ścieków.

7. Streszczenie w języku polskim

BIOREMEDIACJA ZANIECZYSZCZEŃ W EUTROFIZOWANYCH CIECZACH POFERMENTACYJNYCH Z WYKORZYSTANIEM MIKROORGANIZMÓW ORAZ ICH KONSORCJÓW

Słowa kluczowe: mikrobiota autochtoniczna, bioproses, fermentacja metanowa, fermentacja ciemna, biodegradacja

Odnawialne źródła energii są niezwykle istotną alternatywą wobec eksploatacji kurczących się zasobów nieprzyjaznych środowisku paliw kopalnych. Zarówno polityka ekologiczna, jak i strategie energetyczne UE i USA koncentrują się na stopniowej dekarbonizacji, dążąc do neutralności klimatycznej i zerowej emisji do roku 2050. Biologiczne wytwarzanie metanu i wodoru stanowi jedną z najbardziej ekonomicznie efektywnych i korzystnych dla środowiska technologii produkcji energii. Niekwestionowaną zaletą wymienionych bioprosesów jest fakt, iż jako substraty do fermentacji mogą być wykorzystywane trudne do utylizacji surowce odpadowe.

Procesy beztlenowej fermentacji wiążą się z powstawaniem masy pofermentacyjnej, będącej uciążliwym odpadem zawierającym, zależnie od stosowanej technologii, znaczne ilości związków biogenych i/lub materii organicznej, w tym kwasów organicznych. Trudności w zagospodarowaniu tego typu odpadów związane są z licznymi restrykcjami prawnymi oraz wysoką toksycznością, co sprawia, że konieczne jest poszukiwanie nowych metod skutecznego oczyszczania odcieków.

Tematem przewodnim wykonanych doświadczeń było określenie właściwości fizykochemicznych odcieków pofermentacyjnych pochodzących z fermentacji metanowej i fermentacji ciemnej (wodorowej), ich toksyczności wobec drobnoustrojów środowiskowych i mikrobioty osadu czynnego, jak również zawartości frakcji organicznej i związków biogenych. Optymalizowano również biologiczne metody oczyszczania cieczy pofermentacyjnych, wykorzystując potencjał mikroorganizmów allo- i autochtonicznych. W pracy zastosowano szczepy drożdżowe i bakteryjne, jak również konsorcja bakteryjne i mieszane biocenozy bakteryjno-drożdżowe i bakteryjno-algowe. Testowano ponadto możliwości prowadzenia bioremediacji w procesie jedno- oraz dwuetapowym, angażując na poszczególnych etapach różne szczepy drobnoustrojów heterotroficznych i fotoautotroficznych.

Podczas badań wykorzystano szereg metod w celu parametryzacji mikrobiologicznej i biochemicznej odcieków, a także określano kondycję osadu czynnego, wykonywano testy toksyczności względem wybranych drobnoustrojów oraz prowadzono testy oczyszczania odcieków przy użyciu wyspecjalizowanych konsorcjów mikrobiologicznych.

Ustalono, że ciecze pofermentacyjne różniły się znacząco właściwościami i toksycznością, zależnie od rodzaju prowadzonego procesu oraz użytego substratu. Wartości chemicznego zapotrzebowania tlenu mieściły się w szerokim zakresie od 400 do ponad 40 000 mg O₂/L. Podobnie duże różnice stwierdzono w analizach bioróżnorodności mikroflory autochtonicznej: od obserwacji nielicznych, pojedynczych szczepów bakterii po wielogatunkowe biocenozy o liczebności rzędu 10⁷ jtk/mL. Wspólną cechą badanych cieczy była zawartość związków azotu i fosforu, jednak i w tym przypadku stężenia i wzajemne proporcje C:N:P różniły się znacząco.

Wysoki poziom dywersyfikacji odcieków wymagał indywidualnego podejścia; w stosunku do poszczególnych cieczy prowadzono różne zabiegi biologicznego oczyszczania, szukając przy tym możliwości poszerzenia zastosowanych metod na pozostałe próbki.

Badania potwierdziły możliwość stosowania mikroorganizmów allo- i autochtonicznych w procesie oczyszczania cieczy pofermentacyjnych. Uzyskano wysoką wydajność eliminacji głównych zanieczyszczeń: substancji biogennych i związków organicznych, zmniejszono toksyczność względem mikroorganizmów środowiskowych i osadu czynnego. Ponadto, w oparciu o drobnoustroje wyizolowane z odcieków po fermentacji wodorowej wytworzono uniwersalne konsorcjum, którego efektywność działania przewyższała wszystkie pozostałe, testowane warianty. Konsorcjum to podlega obecnie rejestracji i certyfikacji środowiskowej. Wysoki potencjał aplikacyjny proponowanych rozwiązań pozwala stwierdzić, iż optymalizowane metody biologicznego oczyszczania cieczy pofermentacyjnych mogą z powodzeniem zostać zaimplementowane do systemów produkcji biogazu i biowodoru.

8. Streszczenie w języku angielskim

BIOREMEDIATION OF EUTROPHIC POST-FERMENTATION SLUDGE LIQUORS WITH MICROORGANISMS AND THEIR CONSORTIA

Key words: indigenous microbiota, bioprocess, anaerobic digestion, dark fermentation, biodegradation

Renewable energy sources may serve as an important alternative to the use of shrinking resources of fossil fuels whose direct utilization leads to greenhouse gas emissions and atmospheric pollution. Both the EU and US environmental policies as well as energy strategies focus on gradual decarbonization aimed at transition towards climate neutrality with zero emission by 2050. Biological production of methane and hydrogen is one of the most economically-efficient and environmentally friendly energy generation technologies with an unquestionable benefit resulting from the fact that nuisance waste materials can be used as substrates for fermentation.

The processes of anaerobic fermentation are accompanied by generation of large amounts of a liquid digestate pulp, a recalcitrant waste product that contains, depending on particular technology applied, high levels of biogenic substances and/or organic matter including organic acids. Difficulties associated with the proper management of this waste type arise from numerous legal restrictions and high toxicities, which makes it necessary to search for novel and efficient purification methods.

The aim of this study was to characterize physical-chemical properties of digestate liquors obtained upon anaerobic digestion or dark fermentation, to assess toxicities towards environmental microorganisms and activated sludges, as well as to determine the content of organic matter and biogenic compounds. Biological treatment methods were optimized employing specialized allo- and autochthonous microorganisms revealing bioremediation potential: yeast and bacterial strains as well as microbial consortia containing bacteria and mixed bacterial-yeast or bacterial-microalgae biocenoses. Variant bioremediation approaches were tested, which were based on one- or two-stage bioprocess involving different strains of hetero- and photoautotrophic microorganisms.

Several methods were used to analyze microbiological and biochemical parameters of the tested effluents and to determine their influence on the condition of activated sludge. Toxicity tests were carried out with the use of selected microorganisms and digestate liquor purification was performed using the newly obtained microbiological consortia.

It was found that the effluent properties and toxicities differed depending on the type of process and the substrate used. The values of chemical oxygen demand ranged from 400 to over 40,000 mg O₂/L. Similarly, great variability was observed regarding the autochthonous microbiota diversity: from a few single bacterial strains to highly biodiverse biocenoses reaching the number of 10⁷ CFU/mL. The common feature of the effluents was the content of nitrogen and phosphorus compounds, however, both the concentrations and C:N:P ratios showed high variability.

A high level of diversification required an individual approach and therefore each effluent was subjected to specific and different biological treatment actions, while keeping in mind to enable extending the applicability of a particular method toward other samples.

The conducted experiments confirmed the possibility of using allochthonous and indigenous microorganisms in the treatment of post-fermentation effluents. High removal yield was achieved regarding the main pollutants: biogenic substances and organic compounds. The toxicity towards environmental microorganisms and activated sludges decreased dramatically. Moreover, based on the microorganisms isolated from hydrogen fermentation effluents, a universal consortium was constructed whose effectiveness exceeded all the other tested variants. This microbial consortium has been subjected to registration and environmental certification. The high application potential of the proposed solutions allows to conclude that the optimized methods of biological treatment of digester liquors can be successfully implemented for biogas and biohydrogen production systems.

9. Bibliografia

1. Adams G.O., Fufeyin P.T., Okoro S.E., Ehinomen I. 2015. Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. *International Journal of Environmental Bioremediation and Biodegradation*, 3, 28-39, doi: 10.12691/ijebb-3-1-5
2. Adessi A., De Philippis R. 2012. Microbial technologies in advanced biofuels production, *Springer Science*, ISBN: 978146141208, doi: 10.1007/978-1-4614-1208-3_4
3. Agencja Rynku Rolnego. Sprawozdanie za rok 2021, <https://www.gov.pl/web/arimr/sprawozdania-z-dzialalnosci-agencji-restrukturyzacji-i-modernizacji-rolnictwa>
4. Ali H., Khan E., Sajad M.A. 2013. Phytoremediation of heavy metals – concepts and applications. *Chemosphere*, 91, 869–881, doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.01.075
5. Amulya K., Venkateswar Reddy M., Venkata Mohan S. 2014. Acidogenic spent wash valorization through polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis coupled with fermentative biohydrogen production. *Bioresource Technology*, 158, 336–342, doi: 10.1016/j.biortech.2014.02.026
6. Anjum N., Pereira M., Ahmad I., Duarte A., Umar S., Khan N. 2013. Phytotechnologies: remediation of environmental contaminants. *CRC Press: Boca Raton, FL, USA*, ISBN: 9781439875186
7. Antonkiewicz J., Gworek B. 2023. Remediacja zanieczyszczonych gleb i ziemi. *Państwowe Wydawnictwo Naukowe*, ISBN: 9788301228279
8. Argun H., Onaran G. 2016. Hydrogen gas production from wastepaper by sequential dark fermentation and electrohydrolysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41, 8057, doi: 10.1016/j.ijhydene.2015.12.087
9. Asgari M. J., Safavi K., Mortazaeinezhad F. 2011. Landfill biogas production process. *IPCBE*, 9, 208-212, doi: 10.13140/2.1.1761.0886
10. Ashraf, M., Ozturk, M., Ahmad, M.S.A., 2010. Plant adaptation and phytoremediation. *Springer Science*, ISBN: 978-90-481-9369-1, doi: 10.1007/978-90-481-9370-7
11. Augustynowicz J., Kaszycki P., Hanus-Fajerska E. 2013. Rekultywacja skażonej ziemi i wód metodami fito- i bioremediacji. *Aura*, 06, 18-22
12. Beopoulos A., Mrozova Z., Thevenieau F., Le Dall M., Hapala I., Papanikolaou S., Chardot T., Nicaud J. 2008. Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24): 7779-7789, doi: 10.1128/AEM.01412-08
13. Berłowska J., Pielech-Przybylska K., Balcerek M., Cieciora W., Borowski S., Kregiel D. 2017. Integrated bioethanol fermentation/anaerobic digestion for valorization of sugar beet pulp. *Energies*, 10, 1255, doi:10.3390/en10091255
14. Bisswanger H. 2014. Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1, 1-6, 41–55, doi: 10.1016/j.pisc.2014.02.005

15. Borowski S., Kucner M. 2019. The use of sugar beet pulp stillage for co-digestion with sewage sludge and poultry manure, *Waste Management and Research* 10(37), 1025-1032, doi: 201910.1177/0734242X19838610
16. Borowski S., Weatherley L. 2013. Co-digestion of solid poultry manure with municipal sewage sludge. *Bioresource Technology*, 142, 345-352, doi: 10.1016/j.biortech.2013.05.047
17. Britto D. T., Kronzucker H. J. 2002. NH₄⁺ toxicity in higher plants: A critical review. *Journal of Plant Physiology*, 159, 567-584, doi: 10.1078/0176-1617-0774
18. Brzeszcz J. 2016. Drobnoustroje środowiskowe, zdolne do jednoczesnego rozkładu węglowodorów alifatycznych i aromatycznych – perspektywy wykorzystania w praktyce bioremediacji gleb zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi. Praca doktorska, UJ
19. Buraczewski G., 1989. Fermentacja metanowa, *Państwowe Wydawnictwo Naukowe*, ISBN 8301095334
20. Candry P., Huang S., Carvajal-Arroyo J.M., Rabaey K., Ganigue R. 2020. Enrichment and characterization of ethanol chain elongating communities from natural and engineered environments, *Scientific Reports*, 10, 3682, 1-10, doi:10.1038/s41598-020-60052-z
21. Cao Y., Liu H., Liu W., Guo J., Xian M. 2022. Debottlenecking the biological hydrogen production pathway of dark fermentation: insight into the impact of strain improvement, *Microbial Cell Factories* 21: 166, doi: 10.1186/s12934-022-01893-3
22. Chatzimarkakis J., Levoyannis C., Wijk A., Wouters F. 2021. Hydrogen act. Towards the creation of the european hydrogen economy. *Hydrogen Europe*, Dostępne online: https://hydrogeneurope.eu/wp-content/uploads/2021/11/2021.04_HE_Hydrogen-Act_Final.pdf
23. Chatellard L., Marone A., Carrère H., Trably, E. 2017. Trends and challenges in biohydrogen production from agricultural waste. Biohydrogen production: sustainability of current technology and future perspective. *Springer*, India, 2017, 69-95, doi: 10.1007/978-81-322-3577-4_4
24. Chen C.-Y., Chang H.-Y., Chang J.-S. 2015. Producing carbohydrate-rich microalgal biomass grown under mixotrophic conditions as feedstock for biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41, 4413–4420, doi: 10.1016/j.ijhydene.2015
25. Cheng S., Logan B.E. 2007. Sustainable and efficient biohydrogen production via electrohydrogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 18871–18873, doi: 10.1073/pnas.0706379104
26. Cieciura-Włoch W., Binczarski M., Tomaszewska J., Borowski S., Domański J., Dziugan P., Witońska I. 2019. The use of acidic hydrolysates after furfural production from sugar waste biomass as a fermentation medium in the biotechnological production of hydrogen. *Energies*, 12(3222), 1-18, doi: 10.3390/en1217322
27. Cieciura-Włoch W., Borowski S. 2019. Biohydrogen production from wastes of plant and animal origin via dark fermentation. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, 27(2), 130-142, doi: 10.3846/jeelm.2019.9806

28. Cieciora-Włoch W., Borowski S., Domański J. 2020. Dark fermentative hydrogen production from hydrolyzed sugar beet pulp improved by iron addition. *Bioresources Technology*, 314, 123713, doi: 10.1016/j.biortech.2020.123713
29. Cieciora-Włoch W., Borowski S., Domański J. 2021. Dark fermentative hydrogen production from hydrolyzed sugar beet pulp improved by nitrogen and phosphorus supplementation. *Bioresources Technology*, 340(4), 125622, doi: 10.1016/j.biortech.2021.125622
30. Cieciora-Włoch W., Borowski S., Otlewska A. 2020. Biohydrogen production from fruit and vegetable waste, sugar beet pulp and corn silage via dark fermentation. *Renewable Energy*, 153, 1226-1237, doi: 10.1016/j.renene.2020.02.085
31. Cieślik M., Lewicki A., Rodríguez Carmona P.C., Czekala W., Janczak D., Witaszek K., Dach J. 2014. Research on slurry and digestate pulp separation on the solid and liquid fraction. *Archives of waste management and environmental protection*, 16, 2, 43-48, ISSN: 1733-4381
32. Couto N., Fritt-Rasmussen J., Jensen P.E., Højrup M., Rodrigo A.P. i in. 2014. Suitability of oil bioremediation in an arctic soil using surplus heating from an incineration facility. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 6221-6227, doi: 10.1007/s11356-013-2466-3
33. Cui H., Yang B., Gao J., Yang W., Klobučar G, Li M. 2023. Toxicity assessment of wastewater from the industrial parks along Yangtze River, China, using a battery of bioassays. *Research Square*, 1-14, doi: 10.21203/rs-2757587/v1
34. Cukrowski A., Oniszek-Popławska A. 2010. Surowce do produkcji biogazu – uproszczona metoda obliczenia wydajności biogazowni rolniczej. *Czysta energia*, 1, 25-27
35. Cycoń M., Mroziak A., Piotrowska-Seget Z. 2017. Bioaugmentation as a strategy for the remediation of pesticide-polluted soil: A review. *Chemosphere*, 172, 52–71, doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.12.129
36. Cydzik-Kwiatkowska A., Zielińska M. 2016. Bacterial communities in full-scale wastewater treatment systems. *World Journal of Microbiological Biotechnology*, 32(4), 66, doi: 10.1007/s11274-016-2012-9
37. Das D., Veziroglu T. N. 2008. Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 6046, doi: 10.1016/j.ijhydene.2008.07.098
38. Das N., Chandran P. 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnology Research International*, 2011, 1-13, doi: 10.4061/2011/941810
39. Das S. R., Basak N. 2021. Molecular biohydrogen production by dark and photo fermentation from wastes containing starch: recent advancement and future perspective, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44, 1–25, doi: 10.1007/s00449-020-02422-5
40. Dash S. K., Chakraborty S., Elangovan D. 2023. A brief review of hydrogen production methods and their challenges. *Energies*, 16(3), 1141, doi: [10.3390/en16031141](https://doi.org/10.3390/en16031141)

41. Dellagnezze B.M., Vasconcellos S.P., Angelim A.L., Melo V.M.M., Santisi S., Cappello S., Oliveira V.M. 2016. Bioaugmentation strategy employing a microbial consortium immobilized in chitosan beads for oil degradation in mesocosm scale. *Marine Pollution Bulletin*, 107(1), 107–117, doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.04.011
42. Demnerova K., Mackova M., Spevakova, V., Beranova K., Kochankova L. i in. 2005. Two approaches to biological decontamination of groundwater and soil polluted by aromatics characterization of microbial populations. *International Microbiology*, 8, 205-211
43. Deval A.S., Parikh H.A., Kadier A. i in. 2017. Sequential microbial activities mediated bioelectricity production from distillery wastewater using bio-electrochemical system with simultaneous waste remediation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42, 1130–1141, doi: 10.1016/j.ijhydene.2016.11.114
44. Dziga D. 2015. Biowódór – paliwo przyszłości? *Wszechświat*, 116, 1–3, 44
45. Dymaczeński Z. 1995. Poradnik eksploatatora oczyszczalni ścieków, *PZLiTS*, o/Wielkopolski, Poznań, ISBN: 978-83-89696-38-X
46. El Fantroussi S., Agathos S.N. 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Current Opinion in Microbiology*, 8, 268-275, doi: 10.1016/j.mib..2005.04.011
47. Escapa A., San-Martin M.I., Moran A. 2014. Potential use of microbial electrolysis cells in domestic wastewater treatment plants for energy recovery. *Frontiers in Energy Research*, 2, 19, doi: 10.3389/fenrg.2014.00019
48. European Biogas Association. German Biogas Association. Fachverband Biogas. 2018. Dostępne online: <https://www.europeanbiogas.eu/record-breaking-year-for-biomethane-production-shows-eba-gie-biomethane-map-2021>
49. European Commission. 2021. ASSET Study on hydrogen generation in europe: overview of costs and key benefits. Dostępne online: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/c4000448-b84d-11eb-8aca-01aa75ed71a1/language-en>
50. Favas, P., Pratas, J., Varun M., D'Souza R., Paul M. S. 2014. Phytoremediation of soils contaminated with metals and metalloids at mining areas: potential of native flora. *Intech Open Science*, doi: 10.5772/57469
51. Gajewska M., Obarska-Pempkowiak H., Wojciechowska E. 2010. Hydrofitowe oczyszczanie wód i ścieków, *Polskie Wydawnictwo Naukowe*, ISBN: 978-83-01-16420-1
52. Gajkowska-Stefańska L., Guberski S., Gutowski W., Mamak Z., Szperliński Z. 2007. Laboratoryjne badania wody ścieków i osadów ściekowych. Część II. Oficyna Wydawnictwa Politechniki Warszawskiej, Warszawa, ISBN: 978-83-7207-713-4
53. Gekon Projekt nr. GEKON1/O3/213552/28/2015; acronym BiOdPal. Bioconversion of post-fermentation waste generated by biogas-producing plants: protection of waters and production of the III-rd generation fuel. NCBiR, Polska, 2020. Wykonawcy: Ekospot, Kaszycki P., Malec P., Borowski S.
54. Gerardi M. H. 2003. Nitrification and denitrification in the activated sludge process. *John Wiley and Sons*, Nowy Jork, ISBN: 978-0-471-06508-1

55. Gilbert P. M. 2017. Eutrophication, harmful algae and biodiversity — Challenging paradigms in a world of complex nutrient changes. *Marine Pollution Bulletin*, 124 (2), 591-606, doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.04.027
56. Główny Urząd Statystyczny. 2022. Rocznik statystyczny Rzeczypospolitej Polskiej. Dostępne online: <https://stat.gov.pl/en/topics/statistical-yearbooks/statistical-yearbooks/statistical-yearbook-of-the-republic-of-poland-2022,2,24.html>
57. Guo S., Lu Ch., Wang K., Wang J., Zhang Z., Jing Y., Zhang Q. 2020. Enhancement of pH values stability and photo-fermentation biohydrogen production by phosphate buffer. *Bioengineered*, 11(1), 291-300, doi: 10.1080/21655979.2020.1736239
58. Guo X.M., Trably E., Latrille E., Carrere H., Steyer J.-P. 2010. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 10660-10673, doi: 10.1016/j.ijhydene.2010.03.008
59. Haddadi S., Nabi-Bidhendi G., Mehrdadi N. 2014. Nitrogen removal from wastewater through microbial electrolysis cells and cation exchange membrane. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 17, 12, 48, doi: 10.1186/2052-336X-12-48
60. Hajduk A., Dębowski M., Zieliński M., Ligus A. 2016. Efektywność usuwania związków azotu i fosforu ze ścieków mleczarskich w reaktorze beztlenowym z klatkowym systemem mieszania. *Inżynieria Ekologiczna*, 48, 78-87, doi: 10.12912/23920629/63268
61. Hałat-Łaś M., Jedynek P., Malec P., Burczyk J., Vilches A., Kaszycki P. 2018. Application of microbial consortia for biological treatment of post-fermentation effluents from biomethanization of sewage sludge and pig manure. *Przemysł chemiczny*, 97(7), 1000-1005 doi: 10.15199/62.2018.7.32
62. Hałat-Łaś M., Kaszycki P., Malec P., Jedynek P., Borowski S. 2016. Microbial consortia for treatment of anaerobic sludge digester supernatants generated by a laboratory model fermentation system. *New Biotechnology*, 33, 138. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.06.1201>
63. Henze M. 2008. Biological wastewater treatment: principles, modelling and design. *IWA Publishing*, London, ISBN: 9781789060362
64. Hosseini S.E., Abdul Wahid M., Jamil M. 2015. A review on biomass-based hydrogen production for renewable energy supply. *International Journal of Energy Resources*, 39, 1597–1615, doi: 10.1002/er.3381
65. Hosseini S.E., Wahid M.A. 2016. Hydrogen production from renewable and sustainable energy resources: promising green energy carrier for clean development. *Renewable Sustainable Energy Review*, 57, 850–866, doi: 10.1016/j.rser.2015.12.112
66. Hu Ch.Ch., Giannis A., Chen Ch.-L., Qi W., Wang J.-Y. 2013. Comparative study of biohydrogen production by four dark fermentative bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(35), 15686-92, doi: 10.1016/j.ijhydene.2013.03.131
67. Huijan J., Yuan Q., Rein A. 2016. Removal of nitrogen from wastewater using microalgae and microalgae-bacteria consortia, *Environmental science*, 2(1), 1275089, doi: 10.1080/23311843.2016.1275089
68. Hussain I., Puschenreiter M., Gerhard S., Schöftner P., Yousaf S., Wang A., Syed J.H., Reichenauer T.G. 2017. Rhizoremediation of petroleum hydrocarbon-

- contaminated soils: Improvement opportunities and field applications. *Environmental and Experimental Botany*, 147, 202–219, 10.1016/j.envexpbot.2017.12.016
69. Hu Y., Khomenko O., Shi W., Velasco-Sánchez Á., Ashekuzzaman S.M., Bennegadi-Laurent N., Daly K., Fenton O., Healy M.G., Leahy J.J., Sørensen P., Sommer S.G., Taghizadeh-Toosi A., Trinsoutrot-Gattin I. 2021. Systematic review of dairy processing sludge and secondary strubias products used in agriculture. *Frontiers in Sustainanle Food Systems*, 5, 763020, doi: 10.3389/fsufs.2021.763020
 70. Ignatowicz K., Filipczak G., Dybek B., Wałowski G. 2023. Biogas production depending on the substrate used: a review and evaluation study—european examples. *Energies*, 16(2), 798, doi: 10.3390/en16020798
 71. Jabłoński S., Vogt A., Kułczyński M., Łukaszewicz M. 2014. Monitoring i sterowanie procesem technologicznym biogazowni. *Politechnika Wroclawska*, ISBN: 978-83-63503-29-1
 72. Jedynak P., Burczyk J., Borowski S., Kaszycki P., Hałat-Łaś M., Kędra M. i in. 2018. Mikroglony jako czynnik inicjujący oczyszczanie odcieku pofermentacyjnego, powstającego przy produkcji biogazu. *Przemysł chemiczny*, 97(12), 2106-2109, doi: 10.15199/62.2018.12.18
 73. Jedynak P., Mungunkhuyag K., Burczyk J., Waloszek A., Kędra M., Hałat-Łaś M. i in. 2016. Effect of ammonium on growth and photosynthetic activity in selected strains of microalgae dedicated for treatment of effluents from anaerobic fermentation. *New Biotechnology*, 33, 136, doi: 10.1016/j.nbt.2016.06.1194
 74. Jędrzak A. 2008. Biologiczne przetwarzanie odpadów. *Polskie Wydawnictwo Naukowe*, Warszawa, ISBN: 9788301151669
 75. Jiang Y., Su M., Li D. 2014. Removal of sulfide and production of methane from carbon dioxide in microbial fuel cells – microbial electrolysis cell (MFCs–MEC) coupled system. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172, 5, 2720–2731, doi: 10.1007/s12010-013-0718-9
 76. Johnson B. 1975. The enzymes of ammonia assimilation in *Trichosporon cutaneum*. *The Journal of General Microbiology*, 89, 195 – 198, doi: 10.1099/00221287-89-1-195
 77. Kadier A., Kalil M.S., Abdeshahian P. i in. 2016. Recent advances and emerging challenges in microbial electrolysis cells (MECs) for microbial production of hydrogen and value-added chemicals. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 61, 501–525, doi: 10.1016/j.rser.2016.04.017
 78. Kalemka K., Barbusiński K. 2016. Próba współfermentacji osadów ściekowych z odpadami mięsnymi. *Ochrona środowiska*, 38 (4), 21-24
 79. Kamran M., Fazal M. R. 2021. Renewable energy conversion systems. *Elsevier*, ISBN: 9780128235980, doi: 10.1016/B978-0-12-823538-6.00002-6
 80. Kapdan I.K., Kargi F. 2006. Biohydrogen production from waste materials. *Enzyme Microbial Technology*, 38, 569 – 582, doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.09.015
 81. Krzmarzick M.J., Taylor D.K., Fu X., McCutchan A.L. 2018. Diversity and niche of archea in bioremediation, *Archea*, 3194108, doi: 10.1155/2018/3194108
 82. Kasprzycka A. 2011. Przyczyny zakłóceń procesu fermentacji metanowej. *Autobusy. Technika. Eksploatacja. Systemy Transportowe*, 10/2011, 224-228

83. Kaszycki P., Głodniok M., Petryszak P. 2021. Towards a bio-based circular economy in organic waste management and wastewater treatment – The Polish perspective. *New Biotechnology*, 61, 80-89, doi: 10.1016/j.nbt.2020.11.005
84. Kaszycki P., Petryszak P., Przepióra T., Supel P. 2013. Bioremediacja gleby zanieczyszczonej ksenobiotykami z wykorzystaniem autochtonicznych drobnoustrojów glebowych. Podstawy procesu i badania modelowe. *EPISTEME: Czasopismo Naukowo-Kulturalne*, 1(20), 109–122
85. Kaszycki P., Supel P., Petryszak P., 2014. Bacterial population dynamics in waste oily emulsions from the metal-processing industry. *Ecological Engineering*, 15(3), 14–22, doi: 10.12911/22998993.1109117
86. Kaszycki P., Szumilas P., Kołoczek H. 2001. Biopreparat przeznaczony do likwidacji środowiskowych skażeń węglowodorami i ich pochodnymi, *Inżynieria Ekologiczna*, 4, Materiały Konferencji Naukowo-Technicznej pt. „Biopreparaty w ochronie i użytkowaniu środowiska”, Krynica, 15-22
87. Kavamura V.N., Esposito E. 2010. Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. *Biotechnology Advances*, 28(1), 61–69, doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.09.002
88. Keerthana Devi M., Manikandan S., Oviyapriya M., Selvaraj M., Assiri M. A., Vickram S., Subbaiya R., Karmegam N., Ravindran B., Chang S. W., Awasthi M. K. 2022. Recent advances in biogas production using agro-industrial waste: a comprehensive review outlook of techno-economic analysis. *Bioresource Technology*, 363, 127871, doi: 10.1016/j.biortech.2022.127871
89. Khakimova N., Maravić N., Davidović P., Blagojević D., Bečelić-Tomin M., Simeunović J., Pešić V., Šereš Z., Mandić A., Pojić M., Mišan A. 2022. Sugar beet processing wastewater treatment by microalgae through biosorption. *Water*, 14(6), 860, doi: 10.3390/w14060860
90. Khongkliang P., Jehlee A., Kongjan P., Reungsang A., O-Thong S. 2019. High efficient biohydrogen production from oil mill effluent by two-stage dark fermentation and microbial electrolysis under thermophilic condition. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44, 31841-31852, doi: 10.1016/j.ijhydene.2019.10.022
91. Kocwa-Haluch R., Woźniakiewicz T. 2011. Analiza mikroskopowa osadu czynnego i jej rola w kontroli procesu technologicznego oczyszczania ścieków. *Czasopismo Techniczne, Environmental engineering*, 6(108), 141-162
92. Komisja Europejska. Europejski Zielony Ład. 2020. Dostępne online: https://climate.ec.europa.eu/eu-action/european-green-deal/2030-climate-target-plan_pl
93. Kothari R., Singh D.P., Tyagi V.V., Tyagi S.K. 2012. Fermentative hydrogen production – An alternative clean energy source. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(4), 2337-2346, doi: 10.1016/j.resr.2012.01.002
94. Kotay, S.M.; Das, D. 2008 Biohydrogen as a renewable energy resource-prospects and potentials. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 258–63, doi: 10.1016/j.ijhydene.2007.07.031
95. Kowalczyk-Juško A., Szymańska M. 2015. Poferment – nawozem dla rolnictwa. *Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi*, ISBN: 978-83-937363-6-2

96. Kozłowski K., Lewicki A., Cieślik M. 2016. Biologiczne metody produkcji wodoru. *Technika Rolnicza Ogrodnicza Leśna*, 5, 26
97. Krzmarzick M.J., Tylor D.K., Fu X., McCutchan A.L. 2018. Diveristy and niche of archaea in bioremediation. *Archaea*, 3194108, doi: 10.1155/2018/3194108
98. Krysztoforski M. 2011. Sporządzanie kompostów i biopreparatów. *Centrum Doradztwa Rolniczego w Brwinowie*, ISBN: 978-83-60185-79-7
99. Kubacki P., Borowski S. 2014. Physico-chemical characteristic and treatment methods of anaerobic supernatant. *Przemysł Chemiczny*, 93, 528-530, doi: 10.12916/przemchem.2014.528
100. Kubar, A.A., Huang, Q., Kubar K.A., Khan M.A., Sajjad M., Gul S., Yang C., Wang Q., Guo G., Kubar G.M. 2022. Ammonium and phosphate recovery from biogas slurry: multivariate statistical analysis approach. *Sustainability*, 14, 5617, doi: 10.3390/su14095617
101. Kucharska K., Słupek E., Kamiński M. 2019. Biokonwersja materiałów odpadowych do wodoru na drodze fermentacji ciemnej z wykorzystaniem *Enterobacter aerogenes*. *Aparatura badawcza i dydaktyczna*, 1/2019, 5-13
102. Kunatsa T., Xia X. 2022. A review on anaerobic digestion with focus on the role of biomass co-digestion, modelling and optimisation on biogas production and enhancement. *Bioresource technology*, 344, B, 126311, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126311>
103. KwarciaK-Kozłowska A., Bohdziewicz J., Mielczarek K. 2011. Wpływ zmiany stężenia osadu granulowanego na efektywność beztlenowego oczyszczania ścieków generowanych w przemyśle mięsny, *Inżynieria Ekologiczna*, 24, 89-98
104. Kwaśny J., Banach M., Kowalski Z. 2012. Przegląd technologii produkcji biogazu różnego pochodzenia. *Technical transactions Chemistry*, 17, 83-102
105. Lalak J., Kasprzycka A., Murat A., Paprota E. M., Tys J. 2014. Obróbka wstępna biomasy bogatej w lignocelulozę w celu zwiększenia wydajności fermentacji metanowej. *Acta Agrophysica*, 21(1), 51-62
106. Levin D. B., Chahine R. 2010. Challenges for renewable hydrogen production from biomass, *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 4962, doi: 10.1016/j.ijhydene.2009.08.067
107. Lewandowski W. M. 2007. Proekologiczne odnawialne źródła energii, *Wydawnictwo Naukowo-Techniczne*, ISBN: 978832042733
108. Lichtenthaler H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 1987, 148, 350-382, doi: 10.1016/0076-6879(87)48036-1
109. Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z. 2013. Mikrobiologia techniczna, *Polskie Wydawnictwo Naukowe*, ISBN 978-83-01-15222-2
110. Liu S., Yang X., Yao X. 2019. Effects of pH on the biodegradation characteristic of thermophilic microaerobic digestion for sludge stabilization, *Royal Society of Chemistry*, 9, 8379-8388, doi: 10.1039/C9RA00547A
111. Looney, B. BP Statistical Review of World Energy. 2020. Dostępne online: <https://www.bp.com/content/dam/bp/business-sites/en/global/corporate/pdfs/energy-economics/statistical-review/bp-stats-review-2020-full-report.pdf>

112. Luo, S., Chen, B., Lin, L., Wang, X., Tam, N. F., and Luan, T. 2014. Pyrene degradation accelerated by constructed consortium of bacterium and microalga: effects of degradation products on the microalgal growth, *Environmental Science Technology*, 48, 13917–13924, doi: 10.1021/es503761j
113. Łagocka A., Kamiński M., Cholewiński M., Pospolita W. 2016. Korzyści ekologiczne ze stosowania pofermentu z biogazowni rolniczych jako nawozu organicznego. *Kosmos*, 65, 601-607
114. Madhavi G.N., Mohini D.D. 2012. Review paper on – parameters affecting bioremediation. *International journal of life science and pharma research*, 2, 77-80
115. Madison A., Sorsby S., Wang Y., Key T. 2023. Increasing in situ bioremediation effectiveness through field – scale application of molecular biological tools. *Frontiers in Microbiology*, 13, 2022, doi: 10.3389/fmicb.2022.1005871
116. Macaulay B.M. 2014. Understanding the behavior of oil-degrading microorganisms to enhance the microbial remediation of spilled petroleum. *Applied Ecology and Environmental Research*, 13, 247–262, doi: 10.15666/aer/1301_247262
117. Makara A., Kowalski Z., Fela K. 2017. Zagospodarowanie substancji pofermentacyjnej w aspekcie bezpieczeństwa ekologicznego, *Prace Naukowe Akademii im. Jana Długosza w Częstochowie. Technika, Informatyka, Inżynieria Bezpieczeństwa*, 5, 177-190, doi: 10.16926/tiib.2017.05.15
118. Maj K., Koszelnik P. 2016. Metody zagospodarowania osadów dennych. *Journal Of Civil Engineering, Environment And Architecture*, 63, 157-169, doi: 10.7862/rb.2016.118
119. Marchut-Mikołajczyk O., Kwapisz E., Antczak T. 2013. Enzymatyczna bioremediacja ksenobiotyków, 16(1), 39-55
120. Mazowiecka Agencja Energetyczna Sp. z o. o. 2009. Biogaz rolniczy – produkcja i wykorzystanie, Warszawa, dostępne online: http://www.mae.com.pl/files/poradnik_biogazowy_mae.pdf
121. Megret O, Hubert L, Calbry M i in. 2015. Hydrogen production from wastes. State-of-the-art and development potential. Final report.
122. Miksch K., Sikora J. 2010. Biotechnologia ścieków. *Polskie Wydawnictwo Naukowe*, Warszawa, ISBN:978-83-01-16183-5
123. Moritz M. 2012. Biologiczne metody otrzymywania wodoru, *Chemik*, 66 (8), 827
124. Mrozik A. 2016. Mikroorganizmy w bioaugmentacji zanieczyszczonych środowisk. *Postępy Mikrobiologii*, 55(2), 147– 156
125. Mrozik A., Piotrowska-Seget A. 2009. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research*, 165, 363-375, doi: 10.1016/j.micre.2009.08.001
126. Munoz R., Guieysse B., 2006. Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Resources*, 15, 2799-815, doi: 10.1016/j.watres.2006.06.011
127. Mupa M., Kubara R., Gere J. 2018. Extraction, growth and immobilization of *Yarrowia lipolytica* yeast cells for dye effluent treatment. *Archives of Environmental Protection*, 44(1), 48-54, doi: 10.24425/118180

128. Najwyższa Izba Kontroli. 2021. Informacja o wynikach kontroli Zabezpieczenie wód powierzchniowych i podziemnych przed zanieczyszczeniem ściekami komunalnymi pochodzącymi z obszarów nieskanalizowanych, dostępne online: <https://www.nik.gov.pl/kontrole/P/21/066/>
129. Namkoong W., Hwang E.-Y., Park J.-S., Choi J.-Y. 2022. Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting, *Environmental Pollution*, 119, 23-31, doi: 10.1016/S0269-7491(01)00328-1
130. Office of Fossil Energy, United States Department of Energy. 2020. Hydrogen Strategy enabling a low-carbon economy. Dostępne online: https://www.energy.gov/sites/prod/files/2020/07/f76/USDOE_FE_Hydrogen_Strategy_July2020.pdf
131. Oluwaseun A. T., Mgbachi C. A., Okelola M. O., Ajenikoko G. A. 2018. A comparative analysis of renewable energy using biogas and solar photovoltaic systems: A case study of Ajaba, In Osun State. *Control Theory and Informatics*, ISSN: 2224-5774
132. Orsi E., Beekwilder J., Eggink G., Kengen S., Weusthuis R.A. 2021. The transition of *Rhodobacter sphaeroides* into a microbial cell factory. *Biotechnology and bioengineering*, 1128(2), 531-541, doi: 10.1002/bit.27593
133. Patel A.K., Singhanian R.R., Albarico F.P.J.B., Pandey A., Chen Ch.-W., Dong Ch.-D. 2022. Organic wastes bioremediation and its changing prospects, *Science of the total environment*, 824, 153889, doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.153889
134. Podsiadło Ł., Krzyśko–Łupicka T. 2013. Techniki bioremediacji substancji ropopochodnych i metody oceny ich efektywności. *Inżynieria i Ochrona Środowiska*, 16, 4, 459-476
135. Preethi T.M., Usman, M., Banu, J.R., Gunasekaran M., Kumar G. 2019. Biohydrogen production from industrial wastewater: An overview. *Bioresource Technology Reports*, 7, 100287, doi: 10.1016/j.biteb.2019.100287
136. Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. 2002. Microbiology: food and industrial microbiology. *McGraw-Hill*, Boston, 978-981m ISBN: 978-0072556780
137. Puyol D., Batstone D.J., Hulsen T. i in. 2017. Resource recovery from wastewater by biological technologies: opportunities, challenges, and prospects. *Frontiers in Microbiology*, 7, 106, doi: 10.3389/fmicb.2016.02106
138. Rabaey K., Verstraete W. 2005. Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends in Biotechnology*, 23(6), 291-298, doi: 10.1016/j.tibtech.2005.04.008
139. Rai P.K., Singh S., Asthana R. 2012 Biohydrogen production from cheese whey wastewater in a two-step anaerobic process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(6), 1540–1549, doi: 10.1007/s12010-011-9488-4
140. Rao A., Bankar A., Kumar A., Gosavi S., Zinjarde S. 2013. Removal of hexavalent chromium ions by *Yarrowia lipolytica* cells modified with phyto-inspired Fe0/Fe3O4 nanoparticles. *Journal of Contaminant Hydrology*, 146, 63-73, doi: 10.1016/j.jconhyd.2012.12.008

141. Rejman-Burzyńska A., Maksymiak-Lach H., Jędrzyk E. 2013. Potencjał energetyczny biogazu – ocena zasobów surowcowych do produkcji biogazu w Polsce, *Chemik*, 5(67), 446-451
142. Rolka E., Szostek R. 2016. Metody wykorzystywane w remediacji gleb zanieczyszczonych rtęcią. [W] *Rtęć w środowisku: identyfikacja zagrożeń dla zdrowia człowieka. Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego*, 151-159
143. Rozporządzenie Ministra gospodarki morskiej i żeglugi śródlądowej z dnia 12 lipca 2019 r. w sprawie substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego oraz warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzaniu do wód lub do ziemi ścieków, a także przy odprowadzaniu wód opadowych lub roztopowych do wód lub do urządzeń wodnych [Dz. U. 2015 poz. 1311]
144. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 20 stycznia 2015 r. w sprawie procesu odzysku R10 [Dz.U. 2015 poz. 132]
145. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 grudnia 2014 r. w sprawie katalogu odpadów [Dz.U. 2014 poz. 1923]
146. Rychlicki S., Fąfara Z. 2006. Metody usuwania zanieczyszczeń węglowodorowych ze środowiska gruntowo – wodnego. *AGH Uczelniane Wydawnictwa Naukowo-Dydaktyczne*, ISBN: 83746057X, 9788374640572X
147. Sharma A., Bhatii M.S. 2022. Simultaneous removal of organic matter and nutrients from high strength organic wastewater using sequencing batch reactor (SBR). *Processes*, 10(10), 1903, doi: 10.3390/pr10101903
148. Shimizu T., Teramoto H., Inui M. 2019. Engineering the transcriptional activator NifA for the construction of *Rhodobacter sphaeroides* strains that produce hydrogen gas constitutively. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(23-24), 9739-9749, doi: 10.1007/s00253-019-10199-1
149. Sindhu R., Binod P., Pandey A., Ankaram S., Duan I., Awasthi K. M. 2019. Current developments in biotechnology and bioengineering – waste treatment. *Processes for Energy Generation. Elsevier*, ISBN 978-0-444-64083-3
150. Singhal N., Kumar M., Kanaujia P. K., Viridi J. S. 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in microbiology*, 6,791, doi: 10.3389/fmicb.2015.00791
151. Sivagurunathan P., Kuppam Ch., Mudhoo A., Saratale G. D., Kadier A., Zhen G., Chatellard L., Trably E., Kumar G. 2017. A comprehensive review on two-stage integrative schemes for the valorization of dark fermentative effluents, *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(6), 868-882 doi: 10.1080/07388551.2017.1416578
152. Sleutels T.H., Ter Heijne A., Buisman C.J. i in. 2013. Steadystate performance and chemical efficiency of microbial electrolysis cells. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(18), 7201–7208, doi: 10.1016/j.ijhydene.2013.04.067
153. Sobolewska E., Borowski S., Nowicka-Krawczyk P., Banach K. 2022. Treatment of liquid digestate by green algal isolates from artificial eutrophic pond, *Molecules*, 27(20), 6856, doi: 10.3390/molecules27206856
154. Song Ch., Hu X., Liu Z., Li S., Kitamura Y. 2020. Combination of brewery wastewater purification and CO₂ fixation with potential value-added ingredients

- production via different microalgae strains cultivation. *Journal of Cleaner Production*, 268, 122332, doi: 10.1016/j.jclepro.2020.122332
155. Stier E., Fischer M. 1998. Podręczny poradnik eksploatacji oczyszczalni ścieków. *Wydawnictwo Seidel Przywecki sp. z o.o.*, ISBN: 83-909960-0-6
 156. Strong P.J., Burgess J.E. 2008. Treatment methods for wine-related ad distillery wastewaters: a review. *Bioremediation Journal*, 12, 70-87
 157. Suchowska-Kisielewicz M., Myszograj S. 2011. Produkcja biowodoru w procesach biologicznych, *Zeszyty Naukowe. Inżynieria Środowiska*, 144(24), 18, ISSN: 1895-7323
 158. Szatmari D., Sarkany P., Kocsis B., Nagy T., Miseta A., Barko Sz. Longauer B., Robinson R. C., Nyitrai M. 2020. Intracellular ion concentrations and cation-dependent remodelling of bacterial MreB assemblies. *Scientific Reports*, 10, 12002, doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68960-w>
 159. Tam N.F.Y., Wong Y.S. 1996. Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media. *Bioresource technology*, 57, 45-50, doi: 10.1016/0960-8524(96)00045-4
 160. Tambone F., Orzi V., D'Imporzano G., Adani F. 2017. Solid and liquid fractionation of digestate: Mass balane, chemical characterization, and agronomic and environmental value. *Bioresource technology*, 243, 1251-1256, doi: 10.1016/j.biortech.2017.07.130
 161. Tang C.Y., Criddle C.S., Leckie J.O. 2007. Effect of flux (trans membrane pressure) and membranes properties on fouling and rejection of reverse osmosis and nano filtration membranes treating perfluorooctane sulfonate containing wastewater. *Environmental Science and Technology*, 41, 2008-2014, doi: 10.1021/es062052f
 162. Tsao D.T. 2003. Overview of Phytotechnologies. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 78, 1-50, doi: 10.1007/3-540-45991-x_1
 163. Turon V., Trably E., Fouilland E., Steyer J.P. 2016. Potentialities of dark fermentation effluent as substrates for microalgae growth: A review. *Process Biochemistry*, 51(11), 1843-1854, doi: 10.1016/j.procbio.2016.03.018
 164. Turon V., Trably E., Fayet A., Fouilland E., Steyer J. 2015. Raw fermentation effluent to support heterotrophic microalgae growth: microalgae successfully outcompete bacteria for acetate. *Algal Research*, 12, 119-125, doi: 10.1016/j.algal.2015.08.011
 165. Tusseau-Vuillemin M. H. 2001. Do food processing industries contribute to the eutrophication of aquatic systems? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 50 (2), 143-152, <https://doi.org/10.1006/eesa.2001.2083>
 166. Urbanowska A., Kotas P., Kabsch-Korbutowicz M. 2019. Charakterystyka i metody zagospodarowania masy pofermentacyjnej powstającej w biogazowniach. *Ochrona Środowiska*, 41, 39-45
 167. Urzędu Regulacji Energetyki 2021. Sprawozdanie URE za 2021 r. – przekrojowe kompendium wiedzy o rynku energii w Polsce
 168. U. S. Department of Agriculture Foreign Agricultural Service Sugar. 2022. World markets and trade. Dostępne online: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/sugar.pdf>

169. U. S. Department of Energy. DOE National clean hydrogen strategy and roadmap. 2022. Dostępne online: <https://www.hydrogen.energy.gov/pdfs/clean-hydrogen-strategy-roadmap.pdf>
170. U. S. Department of Energy. Hydrogen program plan. 2020. Dostępne online: <https://www.hydrogen.energy.gov/pdfs/hydrogen-program-plan-2020.pdf>
171. Ustawa z dnia 10 kwietnia 1997 r. Prawo energetyczne [Dz.U. 1997 poz. 348]
172. Ustawa z dnia 20 lipca 2017 r. Prawo wodne [DZ.U. 2017 poz. 1566]
173. Walker G.M., Yeasts physiology and biotechnology. 1998. *John Wiley and Sons*, Nowy Jork, ISBN: 978-0-471-96446-9
174. Wałęga A., Chmielowski K., Satora S. 2009. Stan gospodarki wodno-ściekowej w Polsce w aspekcie wdrażania Ramowej Dyrektywy Wodnej. *Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejskich*, 4, 57-72
175. Waraczewska Z., Niewiadomska A., Grzyb A. 2018. Wybrane metody bioremediacji in situ z wykorzystaniem mikroorganizmów. *Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie*, 18, 3(63), 65-78
176. Weiland P. 2010. Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 849–860, doi: 10.1007/s00253-009-2246-7
177. Wilbanks B., Trinh C. T. 2017. Comprehensive characterization of toxicity of fermentative metabolites on microbial growth. *Biotechnology for Biofuels*, 10, 262, 1-11, doi: 10.1186/s13068-017-0952-4
178. Winter, C.J. 2005. Into the hydrogen energy economy-milestones. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30(7), 681–685, doi: 10.1016/j.ijhydene.2004.12.011
179. Witkowska M., Żylicz-Stachula A., Struck A. 2021. Enzymatyczna bioprodukcja wodoru – budowa, właściwości i zastosowanie hydrogenaz. *Postępy mikrobiologii*, 60(3), 231-239, doi: 10.21307/PM-2021.60.3.19
180. Zhou Y., Zhu Y., Zhu J., Li C., Chen G. 2023. A comprehensive review on wastewater nitrogen removal and its recovery processes. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(4), 3429, doi: 10.3390/ijerph20043429
181. Zielińska M., Cydzik-Kwiatkowska A., Zieliński M., Kulikowska D., Wojnowska-Baryła I. 2018. Start-up of a one-stage biofilm reactor for the removal of nitrogen from digester supernatant in the partial nitrification-anammox process, *Annual Set the Environment Protection*, 20, 241-257, ISSN 1506-218
182. Zinjarde S., Apte M., Mohite P., Kumar A. 2014. *Yarrowia lipolytica* and pollutants: interactions and applications. *Biotechnology Advances*, 32(5), 920-933, doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.04.008
183. Zhu S., Higa L., Barela A., Lee C., Chen Y., Du Z. 2023. Microalgal consortia for waste treatment and valuable bioproducts. *Energies*, 16, 884, doi: 10.3390/en16020884