



## **Nowoczesne techniki i technologie inżynierii środowiska**

*Korneliusz Miksch, Grzegorz Cema, Ewa Felis, Adam Sochacki*  
*Politechnika Śląska, Gliwice*

### **1. Wstęp**

Wzrastające stale wymagania dotyczące ochrony środowiska przyrodniczego zachęcają do poszukiwań nowych efektywnych i ekonomicznie atrakcyjnych technologii oczyszczania ścieków, gazów i remediacji gruntów. Coraz częściej, odmiennie niż w przeszłości, w celu efektywnego usuwania zanieczyszczeń stosowane są technologie hybrydowe, łączące procesy biologiczne, chemiczne i fizyczne. W niniejszym przeglądzie omówione będą zarówno wybrane nowoczesne technologie inżynierii środowiska, jak i narzędzia badawcze pozwalające na sterowanie wybranymi procesami biologicznymi, które są zazwyczaj zasadniczym etapem wielu technologii środowiskowych.

### **2. Tlenowe granule drobnoustrojów**

W konwencjonalnych systemach oczyszczania ścieków komory osadu czynnego są zespolone z osadnikami wtórnymi. Wadą tej metody jest między innymi ograniczone obciążenie komór napowietrzania ładunkiem zanieczyszczeń. Bardzo wysokie obciążenie powoduje natomiast nadmierną podaż substratu, intensyfikując syntezę biomasy, jednocześnie ograniczając ilość utlenionych substancji. W konsekwencji stopień oczyszczenia ścieków jest niewystarczający oraz zwiększa się ilość odprowadzanego osadu nadmiernego. Dostrzegając ważność i złożoność tego problemu opracowywano systemy o zwiększonej retencji biomasy. Już w latach 90-tych podano pierwsze rozwiązania, gdzie biomasa im-

mobilizowana była w postaci biofilmu na specjalnych nośnikach [19]. W tym czasie pręźnie rozwinęły się również technologie beztlenowego oczyszczania ścieków w reaktorach UASB, gdzie mikroorganizmy utrzymywane są w dolnej części reaktora w postaci zawieszonych warstwy o specyficznej, granulowanej strukturze. Po analizie procesów zachodzących w reaktorach UASB podjęto próbę opracowania technologii otrzymywania granulowanych form drobnoustrojów w warunkach aerobowych, która zakończyła się pozytywnie [38].

Tlenowe granule o kompaktowej i gęstej strukturze, dużej bioróżnorodności oraz o doskonałych właściwościach sedymentacyjnych wykorzystuje się do oczyszczania ścieków zarówno o niskim, jak i wysokim obciążeniu ładunkiem zanieczyszczeń, do usuwania związków azotu i fosforu, a także toksycznych substancji. Ze względu na sukces jaki odniosła technologia granulowanego osadu w skali laboratoryjnej, sprawdzono jej wydajność w skali pilotowej. Pierwsza stacja pilotowa uruchomiana została we wrześniu 2003 roku w holenderskiej oczyszczalni ścieków w Ede, a w roku 2008 powstały pierwsze oczyszczalnie ścieków komunalnych w Portugalii (Freilas) i Południowej Afryce (Gansbaai) [65]. Doświadczenia z pracy stacji pilotowych wykazały, że biologiczny rozruch reaktorów z granulowaną biomasą wymaga czasu od około 270 do nawet 400 dób, czyli znacznie dłużej niż w skali laboratoryjnej, gdzie czas formowania dojrzałych granul wynosi około 60 dób [31].

Procesowi biogranulacji sprzyja obecność polimerów zewnątrzkomórkowych (EPS), które są substancjami syntetyzowanymi, wydzielanymi i akumulowanymi na zewnątrz komórki. Kompozycja polimerów zewnątrzkomórkowych jest zmienna i zależy od rodzaju mikroorganizmów, a najogólniej podzielić je można na: polisacharydy, białka, DNA i produkty lizy komórek bakteryjnych [63]. EPS odgrywają ważną rolę w procesie biogranulacji, ponieważ pozwalają utrzymywać trójwymiarową i zintegrowaną strukturę granul osadu czynnego.

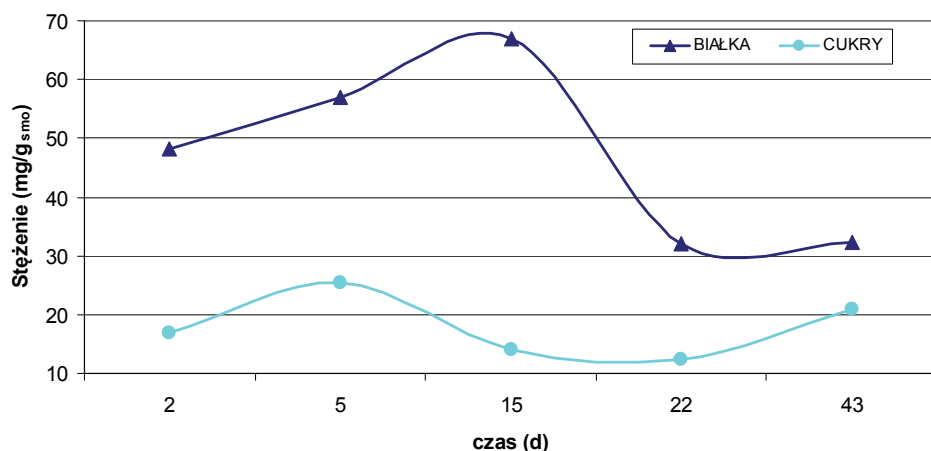
EPS występują w różnych formach bioagregatów, takich jak kłaczkosady czynnego, biofilmy, granule tlenowe i beztlenowe. Jednakże ich stężenie w granulach osadu czynnego jest o wiele większe niż w konwencjonalnym osadzie czynnym [60].

W literaturze można spotkać różne, sprzeczne informacje dotyczące kompozycji EPS w biogranulach. Rezultaty niektórych badań wskazują, że najważniejszym komponentem granul są białka, a stosunek

proteiny/polisacharydy (PN/PS) jest relatywnie stały podczas formowania granul osadu czynnego[44]. Inni badacze natomiast podają, że największą ilość stanowią polisacharydy, które uczestniczą w usieciowaniu polisacharydów i powodują uformowanie trójwymiarowej sieci [37]. Również obecność niektórych kationów wyraźnie sprzyja powstawaniu granul [26].

Najważniejszą rolę w formowaniu granul osadu czynnego odgrywa frakcja mocno związanych polimerów zewnątrzkomórkowych [25]. Rysunek 1 przedstawia wyniki zmiany zawartości poszczególnych komponentów polimerów zewnątrzkomórkowych tejże frakcji wraz z czasem biogranulacji. Obserwowano, że zawartość białek i w mniejszym stopniu polisacharydów wzrasta aż do momentu uformowania pierwszych granul o średnicy 0.4–2mm oraz gęstej i kompaktowej strukturze. Od 16 doby obserwuje się, że zawartość EPS spada, a od dnia 23 utrzymuje się na stałym poziomie.

Zgodnie z Li et al. [29] w momencie uformowania granul, ustala się równowaga pomiędzy procesami akumulacji a metabolizmem, czego rezultatem jest stała zawartość EPS w dojrzałych granulach.



**Rys. 1.** Zmiany frakcji mocno związanych EPS w czasie formowania tlenowych granul [25]

**Fig. 1.** Changes of the fractions of tightly bound EPS during the formation of aerobic granules [25]

Uwzględniając aktualny stan wiedzy dotyczący wykorzystania tlenowych granul mikroorganizmów, można stwierdzić, że:

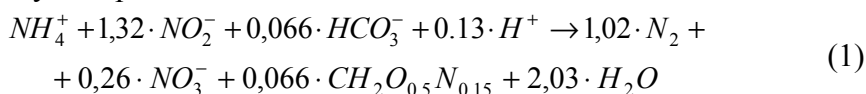
- Zaletą procesów wykorzystujących granulowany osad jest przede wszystkim zmniejszenie wymiarów reaktorów, w których prowadzone są procesy. Dodatkowo zwiększa się czas retencji biomasy w układzie oraz stopień koncentracji biomasy, a poprzez to następuje poprawa efektów oczyszczania ścieków
- Formowanie granul osadu czynnego ściśle wiąże się z produkcją EPS. Mikroorganizmy produkują i akumulują EPS, aż do momentu uformowania stabilnych, gęstych granul.
- Bakterie znajdujące się w wewnętrznej strefie dojrzałych granul zużywają polimery zewnątrzkomórkowe jako dodatkowe źródło węgla, co pozwala im przeżyć i zachować aktywność.
- Polisacharydy są komponentem, który stabilizuje strukturę granul. Mikroorganizmy nie zużywają tych strukturalnych polisacharydów w swoich procesach metabolicznych.
- Białka są dominującą frakcją polimerów zewnątrzkomórkowych.

### **3. Proces częściowej nitryfikacji i Anammox**

Procesy biologiczne, w których następuje usuwanie nieorganicznych związków azotowych podczas oczyszczania ścieków zarówno komunalnych, jak i przemysłowych, do niedawna sprowadzały się praktycznie do nitryfikacji i denitryfikacji. Procesy usuwania azotu są jednymi z najbardziej kosztownych w oczyszczaniu ścieków. Koszty te wynikają ze znacznego zapotrzebowania na energię (napowietrzanie) w procesie nitryfikacji. Energia przeznaczona na napowietrzenie w procesie osadu czynnego stanowi 60–70% całkowitego zużycia energii w oczyszczalni, co stanowi nawet 30% udział w całkowitych kosztach eksploatacji oczyszczalni ścieków. W przypadku ścieków zawierających wysokie stężenia związków azotowych ww. metody mogą być zakłócone poprzez hamowanie nitryfikacji wolnym amoniakiem oraz nieodpowiedni stosunek węgla organicznego do azotu, co w znacznym stopniu ogranicza biologiczną denitryfikację. Aby proces oczyszczania był najefektywniejszy, a jednocześnie niedrogi, poszukuje się alternatywnych metod oczyszczania ścieków. Taką alternatywą może być połączenie procesu częściowej skróconej nitryfikacji oraz odkrytego w latach 90-tych ubie-

głego wieku, a przewidywany już od lat 70-tych [1], proces beztlenowego utleniania amoniaku, czyli Anammox (ang. Anaerobic Ammonium Oxidation). Usuwanie azotu w procesie częściowej nitryfikacji/Anammox pozwala zmniejszyć koszty napowietrzania a co za tym idzie zużycie energii o ponad 60%, ponadto nie ma też potrzeby zapewnienia węgla organicznego, a dodatkowo zmniejsza się emisję CO<sub>2</sub> o ok. 90% co ma duże znaczenie biorąc pod uwagę fakt, że dwutlenek węgla jest jednym z głównych gazów cieplarnianych. Warto też zaznaczyć, że w przeciwieństwie do nitryfikacji/denitryfikacji w procesie Anammox emisja tlenków azotu jest na bardzo niskim poziomie. Ze względu na brak konieczności dozowania zewnętrznego źródła węgla, proces charakteryzuje się małą szybkością wzrostu biomasy (0,08 zamiast prawie 1 g<sub>smo</sub>/gN) co wpływa na relatywnie małą produkcję osadu, a tym samym powoduje zmniejszenie kosztów eksploatacyjnych [7, 40]. Proces częściowej nitryfikacji/Anammox może być realizowany w dwóch osobnych reaktorach [22, 66] lub w jednym reaktorze [2, 5], w którym proces częściowej nitryfikacji i Anammox przebiegają symultanicznie.

Sam proces Anammox polega na utlenianiu azotu amonowego do azotu gazowego z wykorzystaniem azotynów jako ostatniego akceptora elektronów. Opierając się na bilansie masowym, w pomiarach doświadczalnych, Strous i inni [58] zaproponowali następujące równanie stechiometryczne procesu:



Głównym produktem beztlenowego usuwania azotu amonowego jest azot gazowy, jednak około 10% azotu w dopływie jest przekształcana do azotanów. Ogólny bilans azotu pokazuje stosunek molowy równy 1:1,32:0,26 dla przemian amoniaku, azotanów (III) i (V). Przypuszcza się, że część azotanów (III) jest utleniana do azotanów (V) w celu uwolnienia elektronów, które następnie są wykorzystywane do wiązania CO<sub>2</sub> [58].

Bakterie Anammox w systemach oczyszczalni ścieków pozostają aktywne w szerokim zakresie temperatur (pomiędzy 10 a 43°C), z wartością optymalną na poziomie 37°C. Najnowsze doniesienia wskazują, że proces Anammox może być z powodzeniem zastosowany w układach pracujących w temperaturze poniżej 20°C [4]. Biorąc pod uwagę koszty związane z koniecznością utrzymania wysokiej temperatu-

ry w reaktorze, zasadne jest prowadzenie procesu w temperaturach znacznie niższych niż wartości zbliżone do optimum dla bakterii Anammox. Kolejnym parametrem mającym wpływ na przebieg procesu jest wartość pH. Strous [58] wykazał, że zakres pH dla procesu Anammox zawiera się w przedziale 6,7–8,3, z wartością optymalną, wynoszącą 8. Dodatkowo Egli i współpracownicy [12] obserwowali aktywność bakterii Anammox przy pH w zakresie 8,5–9,0. Proces Anammox jest hamowany przez obecność tlenu. Jest to jednak inhibicja odwracalna, co pokazały badania z przerywanym napowietrzaniem, dzięki czemu możliwe jest prowadzenie procesów częściowej nityfikacji i Anammox w jednym reaktorze. Bakterie Anammox charakteryzują się bardzo wysokim powinowactwem do substratów, amoniaku i azotanów (III), dla których stała powinowactwa  $K_S$  jest poniżej  $5 \mu\text{M}$ . Proces jest jednak hamowany przez azot azotanowy (III), chociaż w literaturze nie ma zgodności co do stężeń powodujących inhibicję procesu. Najczęściej podaje się że stężenia przekraczające  $10 \text{ mM}$  ( $140 \text{ mg/dm}^3$ ) powodują inhibicję procesu. Kiedy stężenie azotu azotanowego (III) przekracza  $5 \text{ mM}$  ( $70 \text{ mg/dm}^3$ ) przez dłuższy okres (12 h) aktywność procesu Anammox całkowicie zanika. Jednakże jego aktywność może zostać przywrócona poprzez dodawanie niewielkich ilości (ok.  $50 \mu\text{M}$ ) hydrazyny, która jest produktem pośrednim reakcji Anammox. Jednak ostatnie badania pokazują, że proces ten jest bardziej odporny na stężenia azotu azotanowego (III) niż przypuszczano i stężenie powodujące spadek szybkości procesu o połowę ( $\text{IC}_{50}$ ) wynosi nawet ponad  $350 \text{ mg/dm}^3$  [6]. Dodatkowo, najnowsze badania wskazują, że zakłócenia w prawidłowym przebiegu tego procesu mogą być wynikiem wysokiego stężenia wolnego amoniaku, a prawdopodobne jest też, że wolny amoniak może wzmacniać inhibicję powodowaną azotanami (III) [3, 21].

#### **4. Zaawansowane procesy utleniania w oczyszczaniu ścieków**

Termin *zaawansowane procesy utleniania* (ang. advanced oxidation processes, AOPs) obejmuje wszystkie procesy utleniania chemicznego, których mechanizm bazuje na reakcji z rodnikami hydroksylowymi ( $\text{HO}^\bullet$ ). Rodniki  $\text{HO}^\bullet$ , ze względu na swój wysoki potencjał utleniający ( $E^0=2,7 \text{ V}$ ,  $\text{pH}=7,0$ ) i nieselektywność reagowania ze związkami organicznymi i nieorganicznymi, przyczyniają się do rozkładu (całkowitego

lub częściowego) większości zidentyfikowanych zanieczyszczeń antropogenicznych. Na podstawie danych literaturowych można przyjąć, że w środowisku wodnym, wartości stałych szybkości reakcji związków organicznych i nieorganicznych z rodnikami hydroksylowymi mieszczą się w przedziale  $10^7$ – $10^{10}$  l/mol·s [68].

Nie ma jednoznacznej klasyfikacji procesów zaliczanych do AOPs, jednakże można je podzielić na dwie zasadnicze grupy, tj. chemiczne i fotochemiczne. W chemicznych wolne rodniki generowane są w wyniku przemian związków utleniających, zachodzących w ściśle określonych warunkach. W procesach fotochemicznych, rodniki hydroksylowe powstają na skutek przemian określonych substancji, przy czym przemiany te indukowane są promieniowaniem fotochemicznym [13, 51, 73].

Zaawansowane procesy utleniania stosowane są już nie tylko w skali laboratoryjnej, jak miało to miejsce na początku lat 90. ubiegłego wieku, ale coraz częściej wykorzystywane są w skali pilotażowej [61], a nawet w skali technicznej [28]. W technologii oczyszczania ścieków, procesy AOPs mogą być skojarzone w technikami biologicznymi i mogą być one umiejscowione, tuż po osadnikach wstępnych (jako tzw. utlenianie wstępne) albo na końcu biologicznego stopnia oczyszczania ścieków, czyli po osadnikach wtórnych (tzw. doczyszczanie ścieków lub utlenianie końcowe) [42].

W przypadku łączenia technik AOPs z biologicznym oczyszczaniem ścieków (tzw. systemy hybrydowe), ich znaczenie w procesie oczyszczania ścieków ma ścisły związek z miejscem ich stosowania. I tak, celem utleniania wstępnego jest przede wszystkim częściowe utlenienie substancji biologicznie nierozkładalnych (lub trudno rozkładalnych) i doprowadzenie ich do postaci, w której będą mogły być już dalej rozłożone w procesach biologicznego oczyszczania ścieków. Natomiast celem doczyszczania ścieków jest usunięcie mikrozanieczyszczeń antropogenicznych, które nie są całkowicie usuwane w procesach biologicznego oczyszczania ścieków i mogą wraz ze ściekami oczyszczonymi przedostawać się do wód powierzchniowych, stanowiąc zagrożenie dla organizmów tam bytujących (tzw. detoksykacja ścieków). Zaawansowane procesy utleniania mają także znaczenie w instalacjach do oczyszczania ścieków przemysłowych. Jednakże wskazane jest, aby w przypadku stosowania tego typu rozwiązań, ChZT ścieków nie przekraczało wartości 5,0 g/l. Wynika to z tego, że wyższe stężenie ChZT powoduje wzrost

kosztów zakupu reagentów niezbędnych do wygenerowania odpowiedniej ilości rodników hydroksylowych. Ponadto koszty energii elektrycznej są zbyt wysokie [52].

Należy wspomnieć, że procesy AOPs były skutecznie wykorzystywane do oczyszczania ścieków z przemysłu tekstylnego [27], celulozowo-papierniczego [72], koksowniczego [59] czy winiarsko-gorzelniczego [67]. W przypadku (oczyszczonych) ścieków bytowo-gospodarczych, zastosowanie technik bazujących na zaawansowanych procesach utleniania, pozwoliły na skuteczne usunięcie wybranych zanieczyszczeń antropogenicznych [14,15,17,24,70]. Także w przypadku degradacji wybranych substancji zaliczanych do grupy biomimetyków hormonalnych, procesy AOPs wymieniane są jako potencjalne narzędzie, które może służyć do eliminacji tego typu zanieczyszczeń ze środowiska wodnego [11,16,45].

Pomimo faktu, że zaawansowane procesy utleniania w sposób zadowalający pozwalają na degradację trudno rozkładalnych zanieczyszczeń antropogenicznych w środowisku wodnym, trzeba pamiętać o tym, że są to technologie wymagające stosunkowo wysokich nakładów finansowych. Dlatego ich stosowalność należy rozpatrywać indywidualnie, w zależności od wymaganego efektu końcowego (zwiększenie biodostępności ścieków, detoksykacja, itd.). Mimo określonych mankamentów tych procesów, przede wszystkim z wysokich kosztów inwestycyjnych i eksploatacyjnych, coraz liczniejsze są publikacje potwierdzające różne możliwości zastosowania AOPs. Zatem należy uznać, że procesy te posiadają stosunkowo dobre perspektywy znacznie szerszego niż do tej pory, wykorzystania w skali technicznej.

## **5. Wykorzystanie grzybów w usuwaniu barwników**

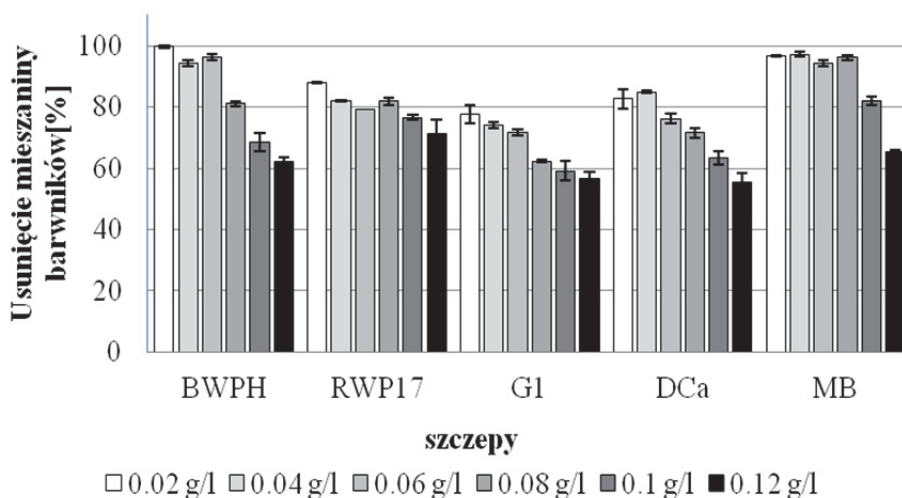
Grzyby stanowią istotny element ekosystemów lądowych, a także i wodnych. posiadają one specyficzne cechy, których pozbawione są inne mikroorganizmy. Między innymi są nielicznymi organizmami skutecznie degradującymi substancje lignino-celulozowych w środowisku. Zwłaszcza ta grupa cieszy się ogromnym zainteresowaniem badaczy, ze względu na swój system enzymatyczny. Grzyby te charakteryzują się małą specyficznością enzymatyczną (system związany z produkcją enzymów zaliczanych do lakaz i peroksydaz), dzięki któremu mogą degradować różnorodne ksenobiotyki takie jak: WWA, pestycydy, czy barwniki syn-



tetyczne. Obecnie zwraca się duża uwagę na barwniki, ponieważ są one odporne na biodegradację w konwencjonalnych systemach oczyszczania ścieków opartych o metodę osadu czynnego. W tym przypadku różnorodne grzyby mogą zostać wykorzystane w dwojaki sposób – jako materiał adsorpcyjny, jak również do enzymatycznej biotransformacji substancji aromatycznych. Podkreśla się, że pomimo tego, iż proces adsorpcji jest szybki i wydajny, to właśnie proces biotransformacji ma w tym przypadku szczególnie duży udział w usuwaniu barwy [10,30]. Biosorpcja natomiast dotyczy głównie grzybów nieligninolitycznych, jak *Aspergillus niger* [18].

Grzyby mogą zostać wykorzystane zarówno do usuwania pojedynczych barwników [48], jak również ich mieszanin [49,50]. Na rysunku 2 przedstawiono efektywność dekoloryzacji mieszaniny zieleni brylantowej i błękitu Evansa (w stosunku 1:1) w zależności od stężenia składników w mieszaninie. Jak wskazują badania, zarówno szczepy zaliczane do grzybów zgnilizny drewna (BWPH i MB – *Pleurotus ostreatus*; RWP17 – *Polyporus picipes*), jak i inne gatunki (DCa – *Gloeophyllum odoratum*; G1 – *Fusarium oxysporum*) mają zdolność usuwania barwników z roztworów wodnych, a efektywność procesu zależy od rodzaju szczepu i stężenia substancji barwnych. Przykładowo, gdy stężenie barwników było w zakresie 0,02–1,2 g/l, efektywność usunięcia przekraczała 50% w ciągu 7 dni [31].

Na efektywność dekoloryzacji wpływają również warunki hodowli. Wstrząsanie prób pozwala na lepsze natlenienie, a także zwiększenie powierzchni kontaktu barwników z biomasą. Jak wskazują wyniki przedstawione w tabeli 1 wytrząsanie pozwoliło na zwiększenie efektywności dekoloryzacji w przypadku wszystkich badanych szczepów w zakresie od 12% (szczep MB) do ponad 27% (szczep G1). Prócz znacznego usunięcia barwy (90% w ciągu 96h w przypadku szczepu MB), korzystnym efektem procesu było również zmniejszenie zoo- i fitotoksyczności prób. Badania toksyczności wykazały, że próby po dekoloryzacji zaklasyfikowano jako toksyczne wobec *Daphnia magna* (III klasa toksyczności), a także jako nietoksyczne (I klasa toksyczności) wobec *Lemna minor* (dekoloryzacja z udziałem szczepów BWPH, RWP17, G1 i MB hodowane w warunkach wytrząsania, w których dekoloryzacja była wyższa). Zatem w procesie uzyskano spadek zootoksyczności i fitotoksyczności odpowiednio o 2 i 3 klasy.



**Rys. 2.** Efektywność dekoloryzacji różnych stężeń mieszaniny barwników przez wybrane szczepy grzybów [49]

**Fig. 2.** Effectiveness of decolorization of different concentrations of the dyes mixture by selected fungal strains [49]

**Tabela 1.** Wyniki 96-h dekoloryzacji mieszaniny barwników (0.08g/l) w próbach wstrząsanych i statycznych oraz testów zoo- i fitotoksyczności [50]

**Table 1.** Results of 96-h decolourization of the dyes mixture (0.08 g/l) and zoo- and phytotoxicity tests [50]

Szczep	Próba	BWPB	RWP17	G1	DCa	MB	Kontrola
% usunięcie mieszaniny po 96h	wytrząsana	83.58	87.13	79.20	84.67	90.13	
	statyczna	67.50	71.00	51.93	65.61	78.00	
Klasa zootoksyczności	wytrząsana	III	III	III	III	III	V
	statyczna	III	III	III	III	III	
Klasa fitotoksyczności	wytrząsana	I	I	I	III	I	IV
	statyczna	I	I	III	III	II	

## 6. Hydrofitowe metody oczyszczania ścieków

Oczyszczalnie hydrofitowe są to systemy inżynierskie, których zasada działania opiera się na imitacji i intensyfikacji procesów usuwania zanieczyszczeń zachodzących w naturalnych mokradłach. W ciągu ostatnich trzech dekad stosowanie oczyszczalni hydrofitowych znacznie się upowszechniło. Układy te uznawane są obecnie za alternatywę wobec bardziej zaawansowanych technicznie rozwiązań w oczyszczaniu ścieków zwłaszcza w małych jednostkach osadniczych [71]. Perspektywiczne kierunki prac badawczych i rozwojowych dotyczących oczyszczalni hydrofitowych można podzielić w zależności od: rodzaju oczyszczanych ścieków, rodzaju zanieczyszczeń, sposobu intensyfikacji procesów oczyszczania ścieków, miejsca zastosowania i aspektów dodatkowych. W początkowych etapach rozwoju oczyszczalnie hydrofitowe były stosowane przede wszystkim do oczyszczania ścieków bytowo-gospodarczych, co nadal jest najczęstszym zastosowaniem tych układów [71]. Zastosowanie i badania dotyczące oczyszczalni hydrofitowych obejmują jednak również oczyszczanie innych rodzajów ścieków np. galwanizerskich [54], z produkcji wina, z produkcji sera, spływów powierzchniowych z terenów lotnisk oraz odcieków składowiskowych [36]. Badania i wykorzystanie oczyszczalni hydrofitowych koncentrowały się pierwotnie na usuwaniu związków organicznych, azotu i fosforu, jednak obecnie coraz większą uwagę poświęca się innym rodzajom zanieczyszczeń. Najnowsze doniesienia skupiają w coraz większym stopniu na usuwaniu takich zanieczyszczeń jak: pierwiastki (zwłaszcza metale, ale również antymon, selen, bor) [55, 56], nanocząstki metali [33], cyjanki [55] i mikrozanieczyszczenia organiczne (np. farmaceutyki i inhibitory korozji) [9, 36]. Jak wspomniano powyżej, jednym z aktualnych kierunków badawczych jest badanie możliwości zintensyfikowania procesów odpowiedzialnych za usuwanie związków organicznych, azotu i fosforu, jak również innych zanieczyszczeń.

Do najczęściej badanych i stosowanych metod zwiększania efektywności usuwania zanieczyszczeń w oczyszczalniach hydrofitowych należy recyrkulacja ścieków. Prowadzi to do zwiększenia usunięcia azotu całkowitego, ale wymaga większych nakładów energetycznych. Można też stosować napowietrzanie złoża i zasilanie szarżowe w celu zwiększenia efektywności nitrifikacji. Inne możliwości to zastosowanie dżdżownic, nadtlenu wodoru [41] lub zmiennego kierunku przepływu ścieków w celu

ograniczenia kolmatacji złoża, czy bioaugmentacja (zwłaszcza w przypadku usuwania zanieczyszczeń refrakcyjnych). Ciekawym rozwiązaniem jest wprowadzanie węgla organicznego (jako wypełnienia złoża lub substancji dodawanej do ścieków surowych) w celu intensyfikacji denitryfikacji lub usuwanie metali poprzez sprzężenie procesu redukcja siarczanów i wytrącanie ich w postaci siarczków) [57]. Również zastosowanie denitryfikacji autotroficznej, ograniczenie możliwości zamarzania złoża, zastosowanie materiałów o zwiększonej pojemności sorpcyjnej względem fosforu [46] są możliwymi do zastosowania sposobami modyfikacji procesu [71]. Ponadto do intensyfikacji usuwania zanieczyszczeń ze ścieków (głównie azotu i fosforu) proponuje się układy hybrydowe, czyli połączenie różnych typów oczyszczalni hydrofitowych. Spośród tych rozwiązań najbardziej popularnym układem jest połączenie złoża o przepływie pionowym i poziomym, co umożliwia prowadzenie nitryfikacji i denitryfikacji ścieków [69]. W praktyce istnieje jednak wiele konfiguracji układów hybrydowych, co uwarunkowane jest rodzajem ścieków, wymaganiami dotyczącymi jakości ścieków oczyszczonych i innymi czynnikami (np. warunki klimatyczne). Jednym z ciekawszych rozwiązań (również pod względem estetycznym) jest połączenie oczyszczania ze złożem (o przepływie pionowym lub poziomym) ze zbiornikiem z wyspą pływającą. Umożliwia to pobieranie substancji biogenych przez akumulację w biomacie roślinnej. W szerszym znaczeniu, układy hybrydowe mogą stanowić połączenie oczyszczalni hydrofitowej z innymi technologiami oczyszczania ścieków (np. z osadem czynnym) lub z takimi naturalnymi procesami jak np. fotodegradacja. Należy wspomnieć, że oczyszczalnie hydrofitowe oprócz zalet (efektywne usuwanie zanieczyszczeń) i znanych wad (np. zwiększone zapotrzebowanie powierzchni) mogą również zostać włączone w przestrzeń miejską. W zakresie tych zastosowań oczyszczalni hydrofitowych można wymienić takie rozwiązania jak zielone dachy, zielone ściany czy ogrody deszczowe [32].

## **7. Fitoremediacja gruntów wspomagana mikoryzacją roślin**

Fitoremediacja to technologia w której wykorzystuje się naturalne zdolności roślin do pobierania i gromadzenia zanieczyszczeń lub do ich biodegradacji. Jest to metoda tania, ale dość długotrwała o efektywności zależnej od wielu czynników [43]. Można przyspieszyć jej przebieg

przez wykorzystanie mikoryzy czyli zjawiska symbiozy pomiędzy żywymi komórkami korzeni roślin a niepatogenicznymi wysoko wyspecjalizowanymi grzybami zasiedlającymi glebę. Grzyby mikoryzowe mogą być wykorzystywane w procesie fitodegradacji, gdyż produkują one enzymy uczestniczące we wstępnych i pośrednich etapach rozkładu ksenobiotyków. Wpływa to korzystnie na dalszy rozkład zanieczyszczeń przez inne organizmy ryzosfery. Grzyby mikoryzowe można wykorzystać np. do intensyfikacji procesów fitoremediacji gruntów zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi [35]

Samoistna kolonizacja podłoża zanieczyszczonego wysokimi stężeniami węglowodorów jest procesem długotrwałym. Czas ten można skrócić przez wprowadzenie propagul grzybów mikoryzowych w formie inokulum. Grzyby stosowane do iniekcji powinny być izolowane z zanieczyszczonych gleb, gdyż są już zaadaptowane do tego rodzaju zanieczyszczeń, co gwarantuje ich przetrwanie i dalszy rozwój. Stopień rozkładu węglowodorów w gruncie zależy od rodzaju zastosowanej modyfikacji. Wykazano, iż najlepsze rezultaty uzyskuje się w procesie bioremediacji prowadzonej z wykorzystaniem roślin jednoliściennych oraz inokulantów grzybów mikoryzowych otrzymanych z gleb zanieczyszczonych. W badaniach stwierdzono, że symbioza grzybów mikoryzowych z roślinami jednoliściennymi powoduje zwiększenie stopnia usunięcia węglowodorów cztero-, pięcio- i sześciopięścieniowych średnio o 15% w porównaniu z konwencjonalnymi metodami [35].

Generalnie można potwierdzić zwiększenie skuteczności oraz szybkości procesu bioremediacji gruntów zanieczyszczonych produktami ropopochodnymi dzięki uprawie roślin o rozbudowanych systemach korzeniowych sprzyjających rozwojowi mikroorganizmów ryzosferowych. W celu oceny jakości gruntów poddawanych oczyszczaniu z substancji ropopochodnych – oprócz analiz fizykochemicznych – wskazane są także badania ekotoksykologiczne uwzględniające wpływ zanieczyszczeń oraz ich metabolitów na organizmy wskaźnikowe.

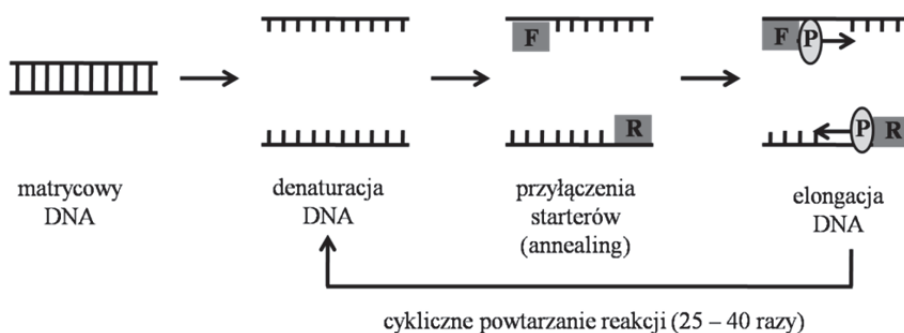
## **8. Techniki biologii molekularnej w inżynierii środowiska**

Bardzo ważnym aspektem zagadnień związanych z inżynierią i ochroną środowiska jest możliwość analizowania składu jakościowego i ilościowego zbiorowisk bakteryjnych, odpowiedzialnych za procesy biotechnologiczne, takie jak bioremediację gruntów [64], oczyszczanie

ścieków [34], czy kompostowanie. Ze względu na fakt, że wyhodowanie większości mikroorganizmów występujących w środowisku nie jest możliwe w laboratorium metodami klasycznej mikrobiologii, z pomocą przychodzą tu techniki biologii molekularnej.

Metody te można podzielić na dwie główne grupy: pośrednie – oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR; ang. Polymerase Chain Reaction) i bezpośrednie, w których amplifikacja metodą PCR nie jest konieczna (należą tu m.in. metody hybrydazyjne i cytometria przepływowa) [23,77].

Technika PCR to reakcja enzymatyczna *in vitro*, naśladująca replikację DNA w komórce. Pozwala ona powielić w znacznej liczbie kopii ściśle określony fragment materiału genetycznego. Tak precyzyjny zakres amplifikacji jest możliwy dzięki zastosowaniu wysoce specyficznych starterów reakcji, flankujących określony region materiału genetycznego, który zostanie poddany kopiowaniu. Schemat reakcji przedstawiono na rysunku 3.



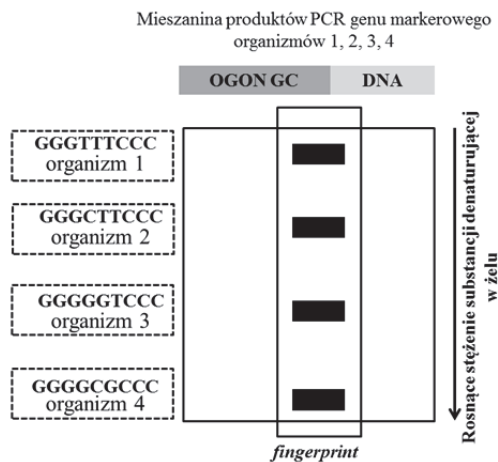
**Rys. 3.** Schemat reakcji PCR [74]

**Fig. 3.** PCR scheme [74]

Podstawowa reakcja PCR została wielokrotnie modyfikowana. Wśród ważniejszych modyfikacji z punktu widzenia monitoringu biocenozy bakteryjnych można wymienić reakcję PCR w czasie rzeczywistym (ang. Real Time PCR), która umożliwia ilościową analizę poszczególnych grup mikroorganizmów w próbce środowiskowej. Metoda ta jest często wykorzystywana w badaniach bakterii glebowych [20], czy osadu czynnego [8]. Drugą z ważnych odmian PCR jest połączenie tej reakcji z odwrotną transkrypcją (RT-PCR; ang. reverse transcriptase PCR), w której właściwa

reakcja amplifikacji PCR poprzedzona jest syntezą cDNA (ang. complementary DNA) na matrycy całkowitego RNA bakteryjnego izolowanego z próbki środowiskowej. RT-PCR jest stosowana do badań aktywności mikrobiocenz w glebie, wodzie czy osadzie czynnym [53].

PCR nieodzownie łączy się z użyciem technik elektroforetycznych, z których na szczególną uwagę zasługuje elektroforeza w gradencie czynnika denaturującego (DGGE; ang. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Amplifikacja PCR prowadzona jest na całkowitym DNA wyizolowanym z próbki środowiskowej i pozwala na uzyskanie amplikonów o takiej samej długości, ale różnej sekwencji DNA (czyli fragmentów o innej temperaturze topnienia). Elektroforeza w gradencie czynnika denaturującego – mocznika, powoduje, że amplikony PCR rozdzielają się w żelu przy różnej wartości stężenia denaturanta tzn. im wyższa temperatura topnienia fragmentu, tym produkt PCR przesunie się na większą odległość w żelu denaturującym [40,76]. W efekcie uzyskuje się tzw. fingerprint, czyli wzór prążkowy, obrazujący złożoność strukturalną zbiorowiska bakteryjnego (rysunek 4).



**Rys. 4.** Schemat elektroforezy w gradencie denaturacji DGGE [74]

**Fig. 4.** Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) scheme [74]

Wśród metod hybrydacyjnych największą popularnością w badaniach mikrobiocenz cieszy się hybrydyzacja fluorescencyjna in situ (FISH; ang. Fluorescent in situ Hybridisation) [75]. Technika ta opiera się na zasadzie komplementarności kwasów nukleinowych. Krótkie frag-

menty DNA (tzw. sondy oligonukleotydydowe) są znakowane barwnikiem fluorescencyjnym i poddawane hybrydyzacji z badaną próbką środowiskową. Preparaty po hybrydyzacji są obserwowane w mikroskopie fluorescencyjnym lub konfokalnym, gdzie istnieje możliwość określenia liczebności poszczególnych grup bakteryjnych w materiale w stosunku do całkowitej liczby bakterii w próbce. Można to osiągnąć poprzez zastosowanie różnych barwników fluorescencyjnych [62].

## 9. Podsumowanie

Postęp w inżynierii środowiska obejmujący wszystkie jej obszary począwszy od uzdatniania wody, poprzez oczyszczanie ścieków, remediację gruntów, zagospodarowanie odpadów, aż do oczyszczania zanieczyszczonych gazów, następuje zazwyczaj w sposób wybiórczy i skokowy. Są takie obszary, gdzie stosowane technologie są dość niezmiennie, ale widoczny jest znaczny rozwój rozwiązań technicznych, a z tym wiąże się istotne zwiększenie ich efektywności. Taka sytuacja wydaje się występować w uzdatnianiu wód i oczyszczaniu gazów. Natomiast w oczyszczaniu ścieków czy remediacji gruntów (rekultywacji gleb), obserwuje się intensywny rozwój nieznanych do niedawna technologii, a dotyczy to w szczególności procesów biologicznych. Związane to jest w dużym stopniu z rozwojem biologii, a w szczególności biologii molekularnej, co pozwala na nieosiągalne dotychczas precyzyjne rozpoznanie i identyfikację aktywnych populacji mikroorganizmów. Ponieważ obserwowany postęp następuje, jak już wspomniano, w sposób skokowy, można więc oczekiwać, że także w innych obszarach inżynierii środowiska takich jak np. inżynieria środowiska wewnętrznego, nastąpi podobny progres.

## Literatura

1. **Broda E.:** *Two kinds of lithotrophs missing in nature.* Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie. 17 (6), 491–493 (1977).
2. **Cema G., Plaza E., Trela J., Surmacz-Górska J.:** *Dissolved oxygen as a factor influencing nitrogen removal rates in one-stage system with partial nitrification and Anammox process.* Water Science and Technology. 64(5), 1009–1015 (2011).
3. **Cema G., Schneider Y., Beier M., Rosenwinkel K-H.:** *Influence of Free Ammonia and Free Nitrous Acid on Anammox Activity.* In proceeding of: WEF/ IWA Nutrient Removal and Recovery 2013: Trends in Resources Recovery and Use, Vancouver, Kanada 2013.



4. **Cema G., Wiszniowski J., Żabczyński S., Zabłocka-Godlewska E., Raszka A., Surmacz-Górska J.:** *Biological nitrogen removal from landfill leachate by deammonification assisted by heterotrophic denitrification in rotating biological contactor (RBC)*. *Water Science and Technology*. 55(8–9), 35–42 (2007).
5. **Cema, G., Szatkowska, B., Plaza, E., Trela, J., Surmacz-Górska, J.:** *Nitrogen removal rates at a technical-scale pilot plant with the one-stage partial nitrification/Anammox process*. *Water Science and Technology*. 54(8), 209–217 (2006).
6. **Dapena-Mora A., Fernandez I., Campos J.L., Mosquera-Corral A., Méndez R., Jetten M.S.M.** *Evaluation of Activity and Inhibition effects on Anammox process by batch tests based on nitrogen gas production*. *Enzyme and Microbial Technology*. 40(4), 859–865 (2007).
7. **De Clippeleir H., Yan X., Verstraete W., Vlaeminck S.E.:** *OLAND is feasible to treat sewage-like nitrogen concentrations at low hydraulic residence time*. *Proceedings of the IWA/WEF Nutrient Recovery and Management*, 9–12 January 2011, Miami, Florida. 1264–1274 (2011).
8. **Dionisi H. M., Harms G., Layton A.C., Gregory I. R., Parker J., Hawkins S.A., Robinson K. G., Saylor G. S.:** *Power Analysis for Real-Time PCR Quantification of Genes in Activated Sludge and Analysis of the Variability Introduced by DNA Extraction*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 11, 6597–6604 (2003).
9. **Dordio A. V., Carvalho A. J. P.:** *Organic xenobiotics removal in constructed wetlands, with emphasis on the importance of the support matrix*. *Journal of Hazardous Materials*. 252, 272–292 (2013).
10. **Dos Santos A., Cervantes F.J., van Lier J.B.:** *Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology*. *Bioresource Technology*. 98, 2369–2385 (2007).
11. **Dudziak M.:** *Badania skuteczności usuwania mykoestrogenów z roztworów wodnych w zintegrowanym procesie sorpcja-rozkład fotokatalityczny-nanofiltracja*. *Rocznik Ochrona Środowiska (Annual Set the Environment Protection)* 15, 1929–1936 (2013).
12. **Egli K., Fanger U., Alvarez P.J.J., Siegrist H., van der Meer J.R., Zehnder A.J.B.:** *Enrichment and characterisation of an anammox bacterium from rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate*. *Archives of Microbiology*. 175, 198–207 (2001).
13. **Esplugas S., Gimenez J., Contreras S., Pascual E., Rodrigez M.:** *Comparison of different advanced oxidation processes for phenol degradation*. *Water Research*. 36, 1034–1042 (2002).

14. **Felis E., Alder A.C., Surmacz-Gorska J., Miksch K.:** *Advanced oxidation of the polycyclic musk fragrances with using UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> processes.* Archives of Environmental Protection. 34, 13–23 (2008).
15. **Felis E., Marciocha D., Surmacz-Górska J., Miksch K.:** *Photochemical degradation of naproxen in the aquatic environment.* Wat. Sci. Tech. 55(12), 281–286 (2007).
16. **Felis E., Miksch K.:** *Nonylphenols degradation in the UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> and UV/O<sub>3</sub> processes – comparison of the methods and kinetic study.* Water Science and Technology. 71(3), 446–453 (2015).
17. **Felis E., Miksch K.:** *Removal of analgesic drugs from the aquatic environment using photochemical methods.* Water Science and Technology. 60, 2253–2259 (2009).
18. **Fu Y., Viraraghavan T.:** *Fungal decolorization of dye wastewater: a review.* Bioresource Technology. 79, 251–262 (2001).
19. **Heijnen J.J., van Loosdrecht M. C. M., Mulder A and Tjihuis L.:** *Formation of Biofilms in a Biofilm Air-Lift Suspension Reactor.* Water Science & Technology. 26(3–4), 647–654 (1992).
20. **Henry S., Baudoin E., López-Gutiérrez J., C., Martin-Laurent F., Brauman A., Philippot L.:** *Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR.* Journal of Microbiological Methods. 59, 3, 327–335 (2004).
21. **Jaroszynski, L., Cicek, N., Sparling, R., Oleszkiewicz, J.:** *Impact of free ammonia on anammox rates (anoxic ammonium oxidation) in a moving bed biofilm reactor.* Chemosphere. 88(2), 188–195 (2012).
22. **Jeanningros Y., Vlaeminck S.E., Kaldate A., Verstraete W.:** *Fast start-up of a pilot-scale deammonification sequencing batch reactor from activated sludge inoculum.* Water Science and Technology. 61(6), 1393–1400 (2010).
23. **Katsanis S.H., Katsanis N.:** *Molecular genetic testing and the future of clinical genomics.* Nature Reviews Genetics. 14, 415–426 (2013).
24. **Klavarioti M., Mantzavinos D., Kassinos D.:** *Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes.* Environmental International. 35, 402–417 (2009).
25. **Kończak B., Fernandez I., Miksch K.:** *Evolución de los polímeros extracelulares de gránulos aerobios durante su formación en el reactor SBR.* Konfer. Proc.” 1st IWA National Young Water Professional Conference”, 16–18.06.2010, Barcelona 2010.
26. **Kończak B., Karcz J., Miksch K.:** *Influence of calcium, magnesium and iron ions on aerobic granulation.* Applied Biochemistry and Biotechnology. 174, 2910–2918 (2014).

27. **Ledakowicz S., Solecka M., Zylla R.:** *Biodegradation, decolourisation and detoxification of textile wastewater enhanced by advanced oxidation processes.* Journal of Biotechnology. 89, 175–184 (2001).
28. **Legrini O.:** *Commercial scale advanced oxidation processes for TOC removal.* Programme and Executive Summaries of 6th IWA Specialist Conference on Oxidation Technologies for Water and Wastewater Treatment. Goslar, Germany, 7–9 May 2012.
29. **Li X-F., Li Y-J., Hua Z-Z., Du G-C. and Chen J.:** *Correlation between extracellular polymeric substances and aerobic biogranulation in membrane bioreactor.* Sep. Purif. Technol. 59, 26–33 (2008).
30. **Liu W., Chao Y., Yang X., Bao H., Qian S.:** *Biodecolorization of azo, anthraquinonic and triphenylmethane dyes by white-rot fungi and a laccase-secreting engineered strain.* Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 31, 127–132 (2004).
31. **Liu Y-Q., Moy B., Kong Y-H., Tay, J-H.:** *Formation, physical characteristics and microbial community structure of aerobic granules in a pilot-scale sequencing batch reactor for real wastewater treatment.* Enzyme and Microbial Technology. 46(6), 520–525 (2010).
32. **Lovell S. T., Johnston D. M.:** *Designing landscapes for performance based on emerging principles in landscape ecology.* Ecology and Society. 14(1), 44 (2009).
33. **Lowry G.V., Espinasse B.P., Badireddy A.R., Richardson C.J., Reinsch B.C., Bryant L.D., Bone A.J., Deonaraine A., Chae S., Therezien M., Colman B.P., Hsu-Kim H., Bernhardt E.S., Matson C.W., Wiesner M.R.:** *Long-term transformation and fate of manufactured Ag nanoparticles in a simulated large scale freshwater emergent wetland.* Environmental Science and Technology. 46, 13, 7027–7036 (2012).
34. **Łuczkiwicz A., Felis E., Ziemińska A., Gnida A., Kotlarska E., Olańczuk-Neyman K., Surmacz-Górska J.:** *Resistance of Escherichia coli and Enterococcus spp. to selected antimicrobial agents present in municipal wastewater.* Journal of Water and Health. 11, 4, 600–612 (2013).
35. **Małachowska-Jutsz A.:** *Mikoryzacja roślin a efektywność fitoremediacji gruntów zanieczyszczonych węglowodorami.* Zeszyty Naukowe Politechniki Śląskiej, nr 1782, Gliwice 2008.
36. **Miksch K., Cema G., Corvini P. F.-X, Felis E., Sochacki A., Surmacz-Górska J., Wiszniewski J., Żabczyński S.:** *R&D priorities in the field of sustainable remediation and purification of agro-industrial and municipal wastewater.* New Biotechnology. 32, 1, 128–132 (2015)

37. **Miksch K., Konczak B.:** *Distribution of Extracellular Polymeric Substances and their Role in Aerobic Granule Formation*. Chemical and Process Engineering. 33(4), 679–688 (2012).
38. **Morgenroth E., Sherden T., van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J.J., Wilderer P.A.:** *Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor*. Wat. Res. 31, 3191–3194 (1997).
39. **Mulder A.:** *The quest for sustainable nitrogen removal technologies*. Water Science and Technology. 48(1), 67–75 (2003).
40. **Muyzer G., Smalla K.:** *Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology*. Antonie van Leeuwenhoek 73, 127–141 (1998).
41. **Nivala J., Rousseau, D.:** *Reversing clogging in subsurface-flow constructed wetlands by hydrogen peroxide treatment: two case studies*. Water Science and Technology 59, 10, 2037–2046 (2009).
42. **Oller I., Malato S., Sanchez-Perez J. A.:** *Combination of advanced oxidation processes and biological treatments for wastewater decontamination – A review*. Science of Total Environment. 409, 4141–4166 (2011).
43. **Panz K., Miksch K.:** *Phytoremediation of explosives (TNT, RDX, HMX) by wild-type and transgenic plants*. Journal of Environmental Management. 113, 85–92 (2012).
44. **Park Ch., Novak J.T., Helm R.F., Ahn Y-O. and Esen A.:** *Evaluation of the extracellular proteins in full-scale activated sludges*. Water Res. 42, 3879–3889 (2008).
45. **Parsons S. (red.):** *Advanced oxidation processes for water and wastewater treatment*. IWA Publishing, London 2005.
46. **Paruch A., Mæhlum T., Obarska-Pempkowiak H., Gajewska M., Wojciechowska E., Ostojski A.:** *Rural domestic wastewater treatment in Norway and Poland: experiences, cooperation and concepts on the improvement of constructed wetland technology*. Water Science and Technology. 63(4), 776–781 (2014).
47. **Pignanelli S.:** *Laboratory diagnosis of Toxoplasma gondii infection with direct and indirect diagnostic techniques*. Indian Journal of Pathology and Microbiology. 54 (4), 786–789 (2011).
48. **Przystaś W., Zabłocka-Godlewska E., Grabińska-Sota E.:** *Biological Removal of Azo and Triphenylmethane Dyes and Toxicity of Process By-Products*. Water Air and Soil Pollution. 223, 1581–1592 (2012).
49. **Przystaś W., Zabłocka-Godlewska E., Grabińska-Sota E.:** *Effectiveness of dyes removal by mixed fungal cultures and toxicity of their metabolites*. Water Air and Soil Pollution. 224, 1534–1543 (2013).

50. **Przystaś W., Zablocka-Godlewska E., Grabińska-Sota E.:** *Efficacy of fungal decolorization of a mixture of dyes belonging to different classes.* Brazilian Journal of Microbiology – zaakceptowany do publikacji 2015.
51. **Rey A., Carbajo J., Adán C., Faraldos M., Bahamonde A., Casas J.A., Rodriguez J.J.:** *Improved mineralization by combined advanced oxidation processes.* Chemical Engineering Journal. 174, 134–142 (2011).
52. **Rizzo L.:** *Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment.* Water Research, 45, 4311–4340 (2011).
53. **Selvaratnam S., Schoedel B.A., McFarland B.L., Kulpa C.F.:** *Application of reverse transcriptase PCR for monitoring expression of the catabolic *dmpN* gene in a phenol-degrading sequencing batch reactor.* Applied and Environmental Microbiology. 61, 11, 3981–3985 (1995).
54. **Sochacki A., Faure O., Guy B., Surmacz-Górska J.:** *Polishing of Real Electroplating Wastewater in Microcosm Fill-and-Drain Constructed Wetlands.* W: The Role of Natural and Constructed Wetlands in Nutrient Cycling and Retention on the Landscape (pod red. Jana Vymazala), Springer International Publishing Switzerland, 2015,
55. **Sochacki A., Surmacz-Górska J., Faure O., Guy B.:** *Microcosm fill-and-drain constructed wetlands for the polishing of synthetic electroplating wastewater.* Chemical Engineering Journal. 251C, 10–16 (2014).
56. **Sochacki A., Surmacz-Górska J., Faure O., Guy B.:** *Polishing of synthetic electroplating wastewater in microcosm upflow constructed wetlands: Effect of operating conditions.* Chemical Engineering Journal. 237, 250–258 (2014).
57. **Sochacki A., Surmacz-Górska J., Faure O., Guy B.:** *Polishing of synthetic electroplating wastewater in microcosm upflow constructed wetlands: Metals removal mechanisms.* Chemical Engineering Journal. 242, 43–52 (2014).
58. **Strous M., Heijnen J. J., Kuenen J. G., Jetten M. S. M.:** *The sequencing batch bioreactor as a powerful tool for the study of slow growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms.* Applied Microbiology and Biotechnology. 50, 589–596 (1998).
59. **Świdorska-Dąbrowska R., Piaskowski K.:** *Wpływ charakteru zanieczyszczeń organicznych na efektywność ich utleniania w procesie Fentona.* Rocznik Ochrona Środowiska (Annual Set the Environment Protection). 15, 1126–1142 (2013).
60. **Tay J.H., Liu Q.S. and Liu Y.:** *The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules.* Lett. Appl. Microbiol. 33, 222–226 (2001).

61. **Ternes T. A., Joss A. (pod red.):** *Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances: The challenge of micropollutants in urban water management.* IWA Publishing, London 2006.
62. **Thamdrup B., Dalsgaard T.:** *Production of  $N_2$  through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments.* Applied and Environmental Microbiology. 68, 1312–1318 (2002).
63. **Tian Y.:** *Behaviour of bacterial extracellular polymeric substances from activated substances from activated sludge: a review,* Int. J. Environment and Pollution. 32(1), 78–89 (2008).
64. **Turek-Szytow J., Ziemińska A., Miksch K., Tekla P., Walawska B., Gluzińska J.:** *Evaluation of the impact of calcium peroxide on soil properties of permanently petroleum-polluted soils.* Przemysł Chemiczny. 91(6), 1209–1213 (2012).
65. **van der Roest H.F., de Bruin L.M.M., Gademan G., Coelho F.:** *Towards sustainable waste water treatment with Dutch Nereda® technology,* Water Practice & Technology. 6(3) (2011).
66. **Vázquez-Padín J., Fernández I., Figueroa M., Mosquera-Corralla A., Campos J-L., Méndez R.:** *Applications of Anammoxnext term based processes to treat anaerobic digester supernatant at room previous temperature.* Bioresource Technology. 100(12), 2988–2994 (2009).
67. **Vilar V.J.P., Maldonado M.I., Oller I., Malato S., Boaventura R.A.R.:** *Solar treatment of cork boiling and bleaching wastewaters in a pilot plant.* Water Research. 43, 4050–4062 (2009).
68. **von Gunten U.:** *Review: Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation.* Water Research. 37, 1443–1467 (2003).
69. **Vymazal J.:** *The use of hybrid constructed wetlands for wastewater treatment with special attention to nitrogen removal: a review of a recent development.* Water Research. 47(14), 4795–4811 (2013).
70. **Włodarczyk-Makula M.:** *Zmiany ilościowe WWA w ściekach oczyszczonych podczas utleniania.* Rocznik Ochrona Środowiska (Annual Set the Environment Protection). 16, 1093–1104 (2011).
71. **Wu S., Kusch P., Brix H., Vymazal J., Dong, R.:** *Development of constructed wetlands in performance intensifications for wastewater treatment: A nitrogen and organic matter targeted review.* Water Research. 57, 40–55 (2014).
72. **Yeber M.C., Rodriguez J., Freer J., Baeza J., Duran N., Mansilla H.D.:** *Advanced oxidation of a pulp mill bleaching wastewater.* Chemosphere. 39, 1679–1688 (1999).
73. **Zarzycki R. (red.):** *Zaawansowane techniki utleniania w ochronie środowiska.* Polska Akademia Nauk Oddział w Łodzi, Łódź 2002.

74. **Ziemińska-Buczyńska A.:** *Dynamika zmian bioróżnorodności zespołów bakterii biorących udział w przemianach związków azotu w złożu tarczowym oczyszczającym ścieki koksownicze.* Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice (w druku), 2015.
75. **Ziemińska A., Ciesielski S., Gnida A., Żabczyński S., Surmacz-Górska J., Miksch K.:** *Comparison of Ammonia-Oxidizing Bacterial Community Structure in Membrane-Assisted Bioreactors Using PCR-DGGE and FISH.* Journal of Microbiology and Biotechnology. 22(8), 1035–1043 (2012).
76. **Ziemińska A., Ciesielski S., Miksch K.:** *Ammonia oxidizing bacteria community in activated sludge monitored by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE).* Journal of General and Applied Microbiology. 55, 373–380 (2009).
77. **Ziemińska A., Ciesielski S., Wiszniowski J.:** *DGGE-based monitoring of bacterial diversity in activated sludge dealing with wastewater contaminated by organic petroleum compounds.* Archives of Environmental Protection. 36(4), 119–125 (2010).

## **Novel Methods and Technologies in Environmental Engineering**

### **Abstract**

The novel technologies used in environmental engineering were discussed in this paper – the formation of aerobic granules, the Anammox process, the advanced oxidation processes, the use of fungi for dyes decolorization, constructed wetlands, the soil phytoremediation supported by rhizosphere microorganisms and the use of molecular biology technique in environmental engineering.

The structure of granular sludge is influenced by EPS production. The average diameter and density of biogranules increase due to EPS production. Although polysaccharides are essential, proteins were found to be the predominant component of aerobic granular sludge. Compared to loosely bound EPS (LB-EPS), tightly bound EPS (TB-EPS) showed more significant correlations with granules formation. This investigation will contribute towards a better understanding of the behavior and composition of EPS in sequencing batch reactors.

The traditional nitrification and denitrification processes proceed well with typical municipal wastewater. Nevertheless, there are also nitrogen-rich wastewater streams like landfill leachate or reject waters from dewatering of digested sludge, for which traditional nitrification/denitrification can be generally ineffective due to free ammonia inhibition of nitrification and unfavorable biode-

gradable carbon content for denitrification. Because of high requirements for oxygen and the necessity for addition of external carbon source, treating such nitrogen-rich streams with nitrification/denitrification would become expensive and unsustainable. The least resources consuming pathway for the conversion of ammonium to nitrogen gas is a combination of partial nitrification and the Anammox process. The main advantages of this process compared to the conventional nitrification/denitrification are: low sludge production, decrease of the aeration costs by almost 60% (only half of the ammonia is oxidized to nitrite in the nitrification process without further oxidation to nitrate), and no need for external organic carbon source addition (Anammox process). Furthermore, anammox bacteria oxidize ammonium under anoxic conditions with nitrite as the electron acceptor, and converse energy for CO<sub>2</sub> fixation. Additionally, the biomass yield of the Anammox process is very low (0.08 kg VSS kg NH<sub>4</sub>-N<sup>-1</sup> in comparison to 1 kg VSS kg NH<sub>4</sub>-N<sup>-1</sup> in conventional nitrification/denitrification process) consequently, little sludge is produced. The low sludge production is another factor that contributes to the substantially lower operation costs compared to conventional denitrification systems.

Advanced oxidation processes (AOPs) are oxidative methods which are based on the generation of the hydroxyl radicals, which are very reactive and less selective than other oxidants. In the wastewater treatment technology, AOPs can be used in a combination with conventional biological techniques (so called hybrid processes), as pre- and post- treatment processes. The advanced oxidation processes have been used in order to increase the biodegradability and also detoxification of the wastewater.

The ability of fungi to degrade lignin-cellulose debris is well known. In addition to these natural molecules they may also degrade synthetic compounds, including synthetic dyes. High effectiveness of Evans blue and brilliant green mixture removal by all tested strains was demonstrated. The process was the most effective and fast in shaken conditions. Finally strain MB removed 90% of tested mixture in shaken samples after 96h. It was the best result reached among all the strains used in the experiment. High removal efficiency was accompanied by a decrease of toxicity (from V class to III class in test with *D. magna* and from IV class even to non-toxic in test with *L. minor*). The highest decrease of phytotoxicity was noticed in samples with shaken biomass in which the effect of dyes mixture elimination was the best. The research indicates very high potential of tested strains for decolorization and detoxification of dyes mixture.

Constructed wetlands are man-made system mimicking the process occurring in natural wetlands. These systems are considered to be an alternative to more technically advanced waste water treatment technologies. The development of constructed wetlands is envisaged to pursue the following directions



grouped according to: the type of the waste water to be treated, target contaminants, treatment intensification methods, ancillary benefits and the locality.

Mycorrhiza fungi can be used for phytoremediation process. They support plant growth by lowering the stress caused by the lack of phosphorus and water. They produce enzymes participating in several stages of xenobiotics decomposition, which is helpful in their further biodegradation performed by the other rhizospheric organisms. The natural colonisation of PAHs contaminated soil is a long-term process. It could be shortened by adding fungal propagules as an inoculum to the soil. Fungi used for the injections should be isolated from PAHs contaminated soil. That guarantees their survival and development in the contaminated environment. The level of PAHs elimination from soil depends on a type of bioremediation modification used. It was shown that the best results are obtained with monocotylous plants combined with bacterial and fungal biopreparations obtained from contaminated soil. The symbiosis of mycorrhiza fungi with monocotylous plants caused ca. 40% increase of 3, 4, 5 and 30% of 6-ring hydrocarbons removal from soil in comparison with the conventional methods.

Important aspect of environmental protection and engineering is the possibility for qualitative and quantitative monitoring of complex microbial communities, responsible for biotechnological processes, such as: soil bioremediation, wastewater treatment or composting.

Due to the fact that most of the environmental bacteria cannot be grown in the laboratory conditions molecular techniques are widely used in environmental engineering. Among these methods the Polymerase Chain Reaction (PCR)-based and hybridization-based (such as Fluorescent in situ Hybridization; FISH) techniques are known to be the most useful.

**Słowa kluczowe:**

tlenowe granule, zewnątrzkomórkowe polimery, częściowa nityfikacja, proces Anammox, zaawansowane procesy utleniania, systemy hybrydowe, oczyszczalnie hydrofitowe, dekoloryzacja barwników, bioremediacji gruntów, mikoryza roślin, techniki biologii molekularne, PCR, FISH

**Keywords:**

aerobic granules, granule formation, extracellular polymeric substances, partially nitrification, Anammox process, advanced oxidation processes, hybrid systems, constructed wetlands, decolorization, synthetic dyes, soil bioremediation, plant mycorrhization, molecular biology techniques, PCR, FISH