



You have downloaded a document from
RE-BUŚ
repository of the University of Silesia in Katowice

Title: Wpływ bioaugmentacji osadu czynnego wyselekcjonowanymi szczepami bakterii oraz ich konsorcjum na efektywność procesu oczyszczania zafenolowanych odcieków ze stawu Kalina

Author: Justyna Michalska

Citation style: Michalska Justyna. (2020). Wpływ bioaugmentacji osadu czynnego wyselekcjonowanymi szczepami bakterii oraz ich konsorcjum na efektywność procesu oczyszczania zafenolowanych odcieków ze stawu Kalina. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

JUSTYNA MICHALSKA

Praca doktorska

Wpływ bioaugmentacji osadu czynnego wyselekcjonowanymi szczepami bakterii oraz ich konsorcjum na efektywność procesu oczyszczania zafenolowanych odcieków ze stawu Kalina

Promotor

prof. dr hab. Agnieszka Mrozik

Uniwersytet Śląski w Katowicach

Praca została sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki, przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2016/23/N/NZ9/00158.

Katowice 2020

Podziękowania

Pragnę złożyć bardzo serdeczne podziękowania Pani prof. dr hab. Agnieszce Mrozik za opiekę merytoryczną i nieocenioną pomoc w trakcie realizowania niniejszej pracy. Dziękuję za udzielone mi cenne uwagi, inspiracje oraz za przekazaną wiedzę, życzliwość, wyrozumiałość, cierpliwość i nieograniczoną dobroć.

Chciałabym również serdecznie podziękować Pani dr Izabeli Greń za nieocenioną pomoc w realizacji badań, pomoc w rozwiązywaniu problemów laboratoryjnych oraz wszelkie inspiracje na temat rozkładu zanieczyszczeń w ściekach.

Dziękuję współautorom publikacji wchodzących w skład niniejszej rozprawy, Pani dr Izabeli Greń, Pani dr Joannie Żur, Panu dr Danielowi Wasilkowskiemu oraz Panu mgr Arturowi Pińskiemu za pomoc w realizacji tych prac.

Chciałabym również wyrazić moją wdzięczność Panu mgr inż. Piotrowi Banaszкови, kierownikowi Chorzowsko-Świętochłowickiego Przedsiębiorstwa Wodociągów i Kanalizacji Sp. z o.o. w Chorzowie, za udostępnienie materiałów do badań oraz nieocenioną pomoc merytoryczną na temat pracy oczyszczalni ścieków.

Specjalnie podziękowania składam Pani dr Bożenie Nowak i Pani dr Joannie Żur za konstruktywne uwagi podczas wykonywania badań i pisania publikacji, a także za owocne dyskusje, nieocenione wsparcie, ogromną życzliwość i nieustającą wiarę we mnie.

Pragnę podziękować Panu Pawłowi Franczakowi za nieocenioną pomoc w modelowaniu i analizach statystycznych, Panu mgr Arturowi Pińskiemu za nieoszacowaną pomoc w analizach genetycznych, Pani dr inż. Agnieszce Gąszczak za pomoc w izolacji szczepów, Pani dr Katarzynie Malarz za pomoc w analizach ATP, a Pani Grażynie Jochymczyk za pomoc w sprawach administracyjnych i nie tylko.

Chciałabym także podziękować Moim Rodzicom, Siostrze, Mojemu Kochanemu Pawłowi i Pani Zuzannie Pierzchale za ogromną wyrozumiałość, niegasnącą wiarę we mnie, cierpliwość i zachęcanie do podejmowania ryzyka.

Spis treści

I. Autoreferat rozprawy.....	4
I.1 Wprowadzenie.....	4
I.2 Cel pracy doktorskiej.....	8
I.3 Materiały i metody.....	9
I.4 Wyniki i dyskusja.....	14
I.4.1.....	14
Charakterystyka fizykochemiczna i mikrobiologiczna odcieków ze stawu Kalina oraz analiza ich wpływu na oczyszczanie ścieków metodą osadu czynnego	
I.4.2.....	18
Charakterystyka wybranych szczepów bakteryjnych pod kątem ich przydatności do bioaugmentacji osadu czynnego obciążonego odciekami ze stawu Kalina	
I.4.3.....	21
Ocena efektywności bioaugmentacji osadu czynnego szczepami <i>P. putida</i> OR45a i <i>P. putida</i> KB3 oraz ich konsorcjum w oczyszczaniu ścieków obciążonych odciekami ze stawu Kalina	
I.5 Literatura.....	25
II. Publikacje wchodzące w skład rozprawy.....	34
II.1.....	35
Michalska J., Greń I., Mroziak A. 2018. Cele, strategie i ocena efektywności bioaugmentacji osadu czynnego zdefiniowanymi mikroorganizmami w usuwaniu toksycznych związków chemicznych. Postępy Mikrobiologii, 57(2): 125-137	
II.2.....	49
Michalska J., Mroziak A. 2018. Zastosowanie bioaugmentacji w procesach biologicznego oczyszczania ścieków i utylizacji osadów. Ochrona Środowiska, 40(1): 35-44	
II.3.....	60
Michalska J., Greń I., Żur J., Wasilkowski D., Mroziak A. 2019. Biological cotreatment of the Kalina pond leachate on laboratory sequencing batch reactor operation and activated sludge quality. Water, 11(8): 1-24	
II.4.....	85
Michalska J., Piński A., Żur J., Mroziak A. 2020a. Selecting bacterial candidates for the bioaugmentation of activated sludge to improve the aerobic treatment of landfill leachate. Water, 12(1): 1-26	
II.5.....	116
Michalska J., Żur J., Piński A., Mroziak A. 2020b. Analysis of the bioaugmentation potential of <i>Pseudomonas putida</i> OR45a and <i>Pseudomonas putida</i> KB3 in the sequencing batch reactors fed with the phenolic landfill leachate. Water, 12(3): 1-21	
III. Podsumowanie.....	141
IV. Streszczenie.....	142
V. Summary.....	145
VI. Oświadczenia doktoranta i współautorów.....	148

I. Autoreferat rozprawy

I.1. Wprowadzenie

Postępująca industrializacja oraz dynamiczny rozwój urbanizacji przyczyniają się do znacznego wzrostu ilości odpadów komunalnych i przemysłowych na świecie. Obecnie średnia ilość odpadów wytwarzanych na świecie w przeliczeniu na jednego mieszkańca wynosi 1,3 miliarda ton rocznie. Na podstawie danych statystycznych szacuje się, że do 2025 roku liczba wytwarzanych na świecie odpadów może osiągnąć poziom 2,2 miliarda ton rocznie [Gupta i Pandey, 2019]. Według danych Głównego Urzędu Statystycznego (GUS) w Polsce w 2018 roku odnotowano wzrost liczby zebranych odpadów komunalnych i przemysłowych w stosunku do roku poprzedniego, odpowiednio o 4,3% i 1,4% [Bochenek i in., 2018]. Pomimo surowych wytycznych w zakresie gospodarowania odpadami ujętych w ramowej Dyrektywie Parlamentu Europejskiego i Rady 2008/98/WE z dnia 19 listopada 2008 roku w sprawie odpadów, w wielu krajach składowanie stanowi nadal jedną z najczęściej stosowanych metod usuwania oraz unieszkodliwiania odpadów [Laner i in., 2012]. W 2018 roku blisko 43% wytworzonych w Polsce odpadów zostało zagospodarowanych w ten sposób na 286 działających w kraju składowiskach. Zlikwidowanie znacznej liczby legalnych składowisk odpadów w Polsce doprowadziło do powstania tzw. dzikich wysypisk odpadów, które nie posiadają zabezpieczeń izolacyjnych i nie są nadzorowane. Ponadto wiele z tych miejsc zlokalizowanych jest na terenach, które umożliwiają migrację zanieczyszczeń do środowiska gruntowo-wodnego [Bochenek i in., 2018, bdl.stat.gov.pl].

Bardzo ważnym problemem związanym z eksploatacją składowiska jest powstawanie odcieków na skutek infiltracji wód opadowych przez złożę odpadów zdeponowanych na składowisku. Zgodnie z Dyrektywą Rady UE nr 1999/31/WE z dnia 26 kwietnia 1999 roku w sprawie składowania odpadów, odciek stanowi „każdy płyn sączący się przez składowane odpady i wydzielany z/lub zawarty w składowisku”. Ocieki ze składowisk odpadów, nazywane często „trudnymi ściekami”, charakteryzują się bardzo złożonym i zróżnicowanym składem, ponieważ wody infiltracyjne przepływając przez składowisko wymywają z niego nie tylko składniki odpadów, ale także produkty reakcji biochemicznych zachodzących w złożu [Cossu i Stegmann, 2018]. Spośród związków nieorganicznych, które stanowią około 80-95% wszystkich oznaczanych w odciekach substancji, największy udział mają azot amonowy, chlorki, siarczany, wodorowęglany i metale, takie jak: arsen, bor, cynk, chrom (VI), kadm, miedź, nikiel, rtęć, potas, sód i żelazo. Natomiast do substancji organicznych, których obecność została potwierdzona w odciekach należą związki fenolowe, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, kwasy huminowe, pestycydy oraz grupa tzw. nowo pojawiających się zanieczyszczeń (*ang. ECs, emerging contaminants*), obejmująca produkty higieny osobistej, farmaceutyki, hormony, środki powierzchniowo czynne i plastyfikatory [Aziz, 2012; Yu i in., 2014; Kapelewska i in., 2016]. Na skład jakościowy odcieków ma wpływ bardzo wiele różnych czynników, m.in. warunki atmosferyczne, skład i wiek zdeponowanych na składowisku odpadów oraz sposób ich składowania, a także aktywność mikroorganizmów obecnych w złożu odpadów [Christensen i in., 2001]. Zmiany w składzie fizykochemicznym odcieków zachodzące wraz z upływem czasu składowania odpadów wskazują na wiek składowiska. Najważniejsze parametry fizykochemiczne odcieków pochodzących ze składowisk o różnym czasie eksploatacji przedstawia Tabela 1.

Zgodnie z Ustawą z 20 lipca 2017 roku Prawo Wodne (Dz. U. 2017, poz. 1566) powstające na składowiskach odpadów wody odciekowe są zaliczane do ścieków przemysłowych, których oczyszczanie jest konieczne przed ich wprowadzeniem do wód lub gleby. W Polsce gospodarka odciekami pochodzącymi ze składowisk odpadów realizowana jest przede wszystkim poprzez ich odprowadzanie do miejskich oczyszczalni ścieków, w których poddawane są one tradycyjnym procesom oczyszczania wspólnie z surowymi ściekami komunalnymi [Kalka, 2012]. Ponieważ ocieki pochodzące ze składowisk odpadów, zwłaszcza tych o długim czasie eksploatacji, mogą zawierać znaczne ilości związków trudno rozkładalnych lub niepodatnych na procesy biodegradacji, ich

wprowadzenie do oczyszczalni ścieków może powodować zahamowanie aktywności biologicznej mikroorganizmów obecnych w tym środowisku i doprowadzić do zakłócenia procesu oczyszczania ścieków [Atkas i Çeçen, 2004; El-Gohary i Hassan, 2016; Pieczykolan i in., 2016; Zheng i in., 2019].

Tabela 1. Charakterystyka fizykochemiczna odcieków pochodzących ze składowisk odpadów.

Parametr	Wiek składowiska, lata			Bibliografia
	Poniżej 5 (młode)	Od 5 do 10	Powyżej 10 (ustabilizowane, stare)	
pH	<6,5	6,5-7,5	>7,5	Foo i Hameed, 2009; El-Fadel i in., 2018; Scott i in., 2005
	3-6	6-7	>7	
ChZT, mg O ₂ /l	>10.000	1.000-4.000	<50-1000	Foo i Hameed, 2009
BZT ₅ , mg O ₂ /l	>4.000	4.000-10.000	>4.000	Foo i Hameed, 2009
N-NH ₄ , mg/l	<400	-	>(300) 400	Foo i Hameed, 2009; El-Fadel i in., 2018; Scott i in., 2005
	500-1.500	300-500	<30-200	

ChZT – chemiczne zapotrzebowanie tlenu; BZT₅ – biochemiczne zapotrzebowanie tlenu; N-NH₄ – azot amonowy

Położony na terenie Świętochłowic w dzielnicy Zgoda staw Kalina (50°16'49"N, 18°55'38"E) stanowi poważny problem środowiskowy dla regionu Górnego Śląska. Zbiornik ten jest silnie zdegradowany i zanieczyszczony związkami pochodzącymi z odcieków ze składowiska odpadów Zakładu Chemicznego Hajduki S.A. w Chorzowie, na którym w latach 1888 – 1990 gromadzone były niebezpieczne odpady powstające w wyniku prowadzonych tam procesów technologicznych, m.in. szlamy wapienne zafenolowane po kaustyfikacji sody, odpady po produktach smolistych, osady z przykładowej oczyszczalni ścieków oraz żużel z zakładowej kotłowni. Brak zabezpieczenia hałdy odpadów spowodował przedostanie się zanieczyszczeń do przylegającego do niej stawu Kalina, w następstwie czego doszło do skażenia zbiornika fenolem, izomerami benzenu, etylobenzenu, toluenu i ksylenu (związkami z grupy BTEX), wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi oraz metalami ciężkimi. Ponadto na dnie stawu zalegają osady o wysoce alkalicznym odczynie pH (od 8,5 do 10,2), zawierające fenole lotne w stężeniu od kilkuset do kilku tysięcy mg/l oraz ChZT powyżej 10 000 mg O₂/l [Tkaczyk i in., 2005; Wrześniak i Kopyczok, 2012]. Jednocześnie staw Kalina oraz jego okolice stanowią dzikie wysypisko odpadów wyrzucanych przez okolicznych mieszkańców. Od 1998 roku ocieki ze stawu Kalina odprowadzane są do mechaniczno-biologicznej oczyszczalni ścieków Klimzowiec w Chorzowie (50°16'42"N, 18°55'35"E). Oczyszczalnia ta jest jednym z największych tego typu obiektów w Polsce o wydajności oczyszczania 5600 m³/h i zlewni o powierzchni wynoszącej około 31,7 km², obejmującej następujące miasta: Chorzów, Świętochłowice, Katowice oraz Rudę Śląską. Oczyszczanie ścieków w oczyszczalni Klimzowiec oparte jest na technologii osadu czynnego w systemie Bardenpho, który składa się ze strefy denitryfikacji/defosfatacji, trzech reaktorów denitryfikacyjnych i pięciu bioreaktorów nityfikacyjnych z trzema niezależnymi strefami napowietrzania [Michalska i in., 2019]. W 2014 roku rozpoczęto rewitalizację stawu Kalina, w ramach której podjęto próbę usunięcia toksycznych osadów zalegających na dnie zbiornika. Efektem tych działań było znaczne zwiększenie stężenia związków fenolowych w ściekach odprowadzanych do oczyszczalni ścieków Klimzowiec do około 1700 mg/l (dane ujawnione przez firmę VIG Sp. z o.o., odpowiedzialną za rewitalizację stawu), które negatywnie wpłynęły na pracę oczyszczalni [Michalska i in. 2020b].

Technologia osadu czynnego jest jednym z najczęściej wykorzystywanych w Polsce systemów biologicznego oczyszczania ścieków [Liwarska-Bizukojc, 2019; Piotrowski i in., 2019]. W wielu doniesieniach literaturowych można znaleźć informacje o zakończonych sukcesem próbach zastosowania technologii konwencjonalnego i granulowanego osadu czynnego w procesie

współoczyszczania wód odciekowych i ścieków [Ranjan i in., 2016; Ren i in., 2017; de Freitas Bueno i in., 2019]. Z przeglądu literatury wynika jednak, że w przeważającej większości badań wpływ wprowadzonych do bioreaktora odcieków na osad czynny i proces oczyszczania ścieków był negatywny [Pieczykolan i in., 2016; Brennan i in., 2017; Bolyard i in., 2018; Çeçen i Tezel, 2018; De Albuquerque i in., 2018]. Z tego powodu wielu autorów stosuje w badaniach fizykochemiczne metody podczyszczania wód odciekowych przed ich wprowadzeniem do systemu biologicznego oczyszczania [Pala i Erden, 2004; Neczaj i in., 2007; Xiao i in., 2013]. Zabiegi te są jednakże drogie i mogą prowadzić do wtórnego zanieczyszczenia środowiska [Lippi i in., 2018]. Zastosowanie technologii osadu czynnego w oczyszczalniach ścieków stanowi rozwiązanie bardziej przyjazne dla środowiska i korzystne z punktu widzenia kosztów inwestycyjnych w porównaniu z zaawansowanymi technologicznie fizykochemicznymi procesami oczyszczania [Ahmed i in., 2017]. Kontrola nad wpływem odprowadzanych do ścieków wód odciekowych na funkcjonowanie osadu czynnego prowadzona jest obecnie poprzez utrzymywanie odpowiedniego stosunku objętościowego pomiędzy ściekami i odciekami. W związku z tym wolumetryczny udział odcieków ze składowisk w oczyszczalniach zwykle nie przekracza 10% odprowadzanych do nich ścieków [Kalka, 2012; Campos i in., 2014; Faudala-Książek i in., 2014].

Atrakcyjnym rozwiązaniem problemów wielu oczyszczalni ścieków, związanych z ich narażeniem na obecność wysokich stężeń wód odciekowych w ściekach, wydaje się być wprowadzanie do środowiska osadu czynnego wyselekcjonowanych szczepów lub konsorcjów mikroorganizmów w celu wzmocnienia potencjału degradacyjnego mikroorganizmów autochtonicznych oraz poprawy stanu osadu czynnego, określane mianem bioaugmentacji [Gerardi, 2016]. Badania potwierdziły, że bioaugmentacja osadu może przyczynić się nie tylko do poprawy zdolności degradacyjnych obecnych w nim drobnoustrojów, ale również skutecznie wspomagać wydajność bioreaktora poprzez ochronę zespołów mikroorganizmów autochtonicznych oraz kompensować przeciążenie organiczne i hydrauliczne osadu [Zhang i in., 2017]. Aplikacyjne wykorzystanie tej strategii w oczyszczalniach ścieków nie jest jednak zbyt często praktykowane, ponieważ los inokulowanych do osadu czynnego mikroorganizmów jest trudny do przewidzenia i monitorowania [Dueholm i in., 2015; Zhang i in., 2017]. Wyselekcjonowane szczepy bakterii czy grzybów wprowadzone do osadu są często narażone na wpływ różnych czynników, m.in. na złożone interakcje z mikroorganizmami autochtonicznymi, zerowanie pierwotniaków czy wymywanie z bioreaktora wraz ze ściekami [Ikeda-Ohtsubo i in., 2013; Yao i in., 2013; Fenu i in., 2015]. Uważa się, że bioaugmentacja osadu czynnego z użyciem konsorcjów mikroorganizmów może stanowić bardziej skuteczną strategię w oczyszczaniu trudnych ścieków, ponieważ konsorcja są zazwyczaj zdolne do rozkładu wielu związków jednocześnie, co wynika z uzupełniania się ich zdolności degradacyjnych, a także może być konsekwencją ich mniejszej wrażliwości na zmiany czynników środowiskowych w porównaniu z pojedynczymi szczepami [Morris i in., 2018; Hardo i in., 2019]. Dotychczas jednak większość badań skupiała się na wykorzystaniu pojedynczych szczepów bakterii do bioaugmentacji osadu czynnego oczyszczającego ścieki syntetyczne, zanieczyszczone jednym lub kilkoma wybranymi związkami chemicznymi [Cirja i in., 2009; Xenofontos i in., 2016; Ji i in., 2019]. Natomiast doniesienia o zastosowaniu tej strategii do wspomagania oczyszczania ścieków obciążonych wodami odciekowymi w osadzie czynnym są wciąż ograniczone [Yu i in., 2014; Dadrasnia i in., 2017]. Dokładne cele, strategie i ocenę efektywności bioaugmentacji osadu czynnego zdefiniowanymi mikroorganizmami w usuwaniu toksycznych związków chemicznych oraz zastosowanie bioaugmentacji w procesach biologicznego oczyszczania ścieków przedstawiono w artykułach przeglądowych, odpowiednio **Michalskiej i in. (2018)** oraz **Michalskiej i Mroziak (2018)**, zamieszczonych w rozdziale **II.1** i **II.2** niniejszej rozprawy doktorskiej.

Proces selekcji mikroorganizmów o potencjalnym znaczeniu w bioaugmentacji osadu czynnego obciążonego odciekami ze składowisk odpadów powinien polegać na zbadaniu i ocenie ich potencjału degradacyjnego w kierunku rozkładu zanieczyszczeń występujących w wodach odciekowych [Nguen i in., 2017; Zhang i in., 2017]. Wprowadzenie do osadu czynnego bakterii o pożądanym potencjale

metabolicznym nie zawsze prowadzi jednak do zwiększonego usuwania zanieczyszczeń w ściekach [Yu i Mohn, 2002; Monsalvo i in., 2012]. Kluczowe znaczenie dla osiągnięcia efektywnego rozkładu zanieczyszczeń w osadzie czynnym bioaugmentowanym wyselekcjonowanymi szczepami bakterii ma ich zdolność do inkorporacji w strukturę kłaczków osadu, która ułatwia im pobieranie substancji odżywczych, zapewnia ochronę przed atakiem pierwotniaków i pozwala na egzystencję w tym ekosystemie. W związku z tym wybrane do bioaugmentacji szczepy bakterii powinny cechować się zdolnościami do agregacji, adhezji, bioflokulacji i produkcji macierzy egzopolisacharydowej (EPS), odgrywającymi kluczową rolę w procesie formowania kłaczków [Monsalvo i in., 2012; Liu i in., 2015; Gupta i Thakur, 2016]. Inną, pożądaną cechą szczepów wybranych do inokulacji osadu jest ich zdolność do komunikowania się ze sobą poprzez wydzielanie do otoczenia i rozpoznawanie cząsteczek sygnałowych, tzw. autoinduktorów, znane pod nazwą quorum sensing. Wydzielanie autoinduktorów przez bakterie introdukowane do osadu czynnego może wspomagać ich międzykomórkową komunikację z mikroorganizmami autochtonicznymi i w ten sposób umożliwiać skuteczne zasiedlanie tego środowiska [Wang i in., 2013]. Selekcja kandydatów do bioaugmentacji osadu czynnego powinna także obejmować charakterystykę wybranych bakterii pod kątem ich zdolności do wspomagania biodegradacji zanieczyszczeń w ściekach i posiadania mechanizmów chroniących je przed toksycznym działaniem związków chemicznych [Herrero i Stuckey, 2015]. Ponieważ mikrobiologiczny rozkład zanieczyszczeń może być utrudniony z powodu hydrofobowego charakteru obecnych w ściekach substancji i wiążącej się z nim ograniczonej dostępności dla komórek bakterii, pożądaną cechą kandydatów do bioaugmentacji jest ich zdolność do syntezy związków powierzchniowo czynnych, czyli biosurfaktantów [Cirja i in., 2009; Chen i in., 2012].

Proces osadu czynnego jest zwykle monitorowany poprzez pomiar standardowych parametrów operacyjnych, takich jak: zawartość zawiesin ogólnych (*ang.* *MLSS, mixed liquor suspended solids*), zawartość całkowitego fosforu i azotu, pH, biochemiczne zapotrzebowanie tlenu (BZT) i chemiczne zapotrzebowanie tlenu (ChZT). Kontrola tych parametrów dostarcza informacji o gwałtownych zakłóceniach procesu oczyszczania ścieków, natomiast nie pozwala na stwierdzenie pogorszenia się właściwości osadu czynnego i obniżenia jego aktywności. Uzyskiwanie informacji dotyczących stanu fizjologicznego osadu czynnego oraz procesów biochemicznych zachodzących w komorach biologicznych pozwala na szybkie podjęcie działań służących ochronie mikroorganizmów autochtonicznych występujących w osadzie przed działaniem substancji toksycznych i zapobieżenie długotrwałemu zaburzeniu pracy oczyszczalni ścieków. Dlatego też połączenie monitoringu standardowych parametrów operacyjnych z pomiarem wskaźników pozwalających na określenie kondycji osadu czynnego, między innymi: właściwej szybkości pobierania tlenu (*ang.* *SOUR, specific oxygen uptake rate*), stężenia całkowitego, zawieszonego i wewnątrzkomórkowego ATP, aktywności kluczowych enzymów zaangażowanych w procesie mikrobiologicznego rozkładu zanieczyszczeń w ściekach (dehydrogenaz, esteraz i katalaz) oraz analizy potencjału funkcjonalnego zespołów mikroorganizmów [Bergeron i Paice, 2001; Drewnowski, 2014; Moretti i in., 2015], wydaje się być użyteczną strategią pozwalającą na zidentyfikowanie czynników wpływających na działanie i jakość osadu czynnego, szczególnie gdy osiągają one poziomy krytyczne. Ustalenie ważnych zależności pomiędzy parametrami operacyjnymi procesu oczyszczania ścieków a bioindykatorami odpowiedzi osadu czynnego na czynniki stresowe i zaburzenia może ułatwić optymalizację procesu oczyszczania ścieków i usprawnić działanie oczyszczalni bez konieczności wykonywania kosztownych analiz genetycznych.

I.2. Cel pracy doktorskiej

Współczyszczanie odcieków ze składowisk odpadów wraz ze ściekami komunalnymi w biologicznych oczyszczalniach ścieków stanowi w Polsce powszechną praktykę. Ze względu jednak na zróżnicowany skład i potencjalną toksyczność wody odciekowe mogą stanowić poważne zagrożenie dla mikroorganizmów osadu czynnego i niekorzystnie wpływać na proces usuwania zanieczyszczeń w ściekach. Obecnie proces współczyszczania odcieków ze ściekami kontrolowany jest przede wszystkim poprzez utrzymywanie ich odpowiedniego stosunku objętościowego. W związku z tym w niniejszej pracy doktorskiej podjęto próbę zastosowania bioaugmentacji osadu czynnego z użyciem nowo wyizolowanych i wyselekcjonowanych bakterii w procesie biologicznego współczyszczania odcieków z osadów dennych stawu Kalina i ścieków imitujących ścieki komunalne odprowadzane do oczyszczalni ścieków Klimzowiec, których stosunek wolumetryczny wynosił 3,5%, 5,5% oraz 12,5%.

Aby osiągnąć powyższy cel, podjęte zadania badawcze obejmowały:

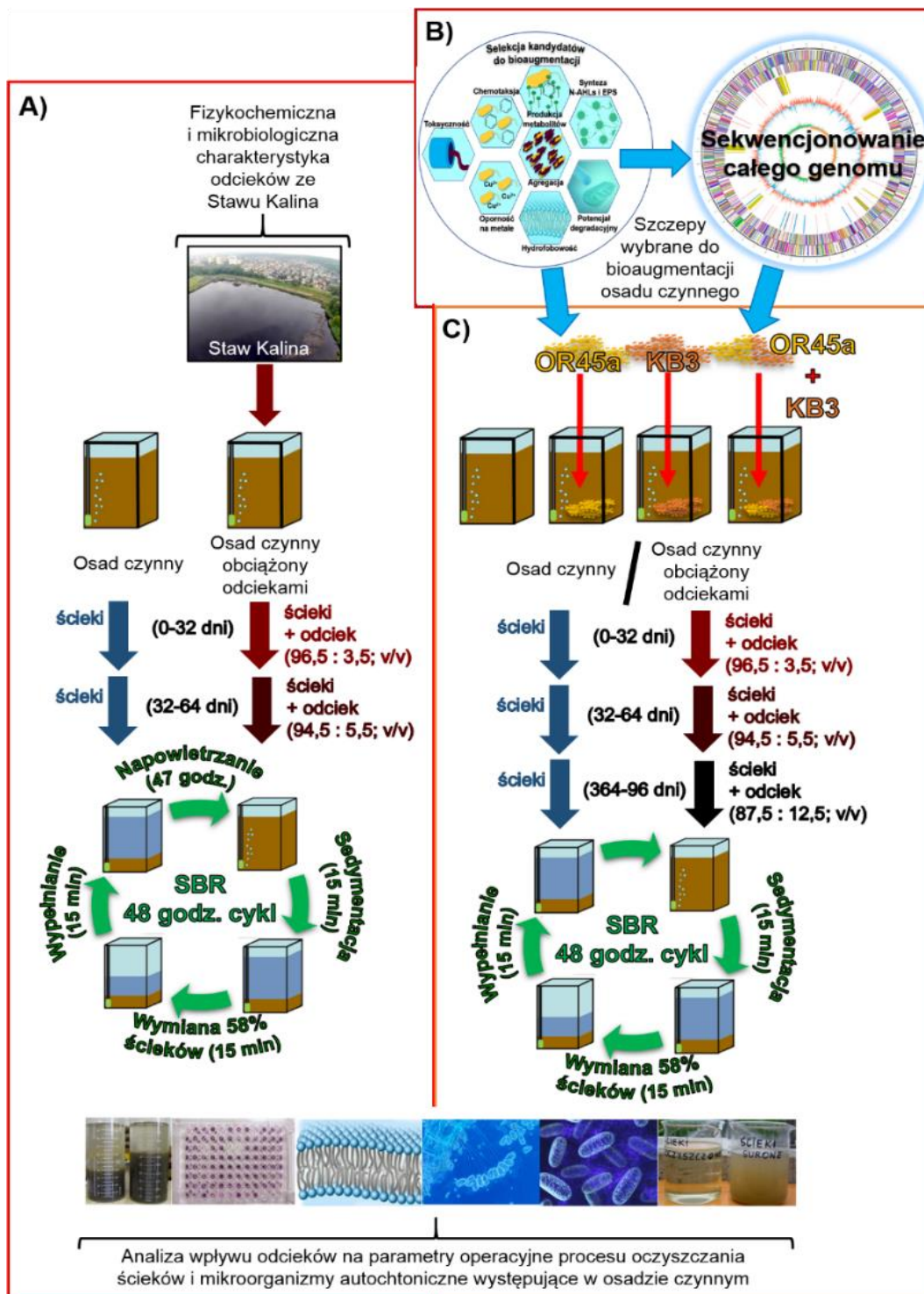
1. Analizę składu fizykochemicznego i mikrobiologicznego odcieków,
2. Określenie toksyczności ostrej i chronicznej odcieków względem mikroorganizmów autochtonicznych osadu czynnego,
3. Ocenę zmian parametrów operacyjnych procesu współczyszczania odcieków i ścieków,
4. Analizę wpływu odcieków na stan fizjologiczny, potencjał funkcjonalny, różnorodność strukturalną mikroorganizmów autochtonicznych i strukturę kłaczków osadu czynnego,
5. Ocenę przydatności nowo wyizolowanych ze środowiska szczepów bakterii oraz wybranych szczepów bakterii pochodzących z kolekcji depozytowych (polskich i zagranicznych) do bioaugmentacji osadu czynnego obciążonego odciekami ze stawu Kalina na podstawie ich potencjału degradacyjnego w kierunku rozkładu konkretnych związków aromatycznych, zdolności do produkcji związków wspomagających rozkład zanieczyszczeń w ściekach oraz przeżywalności w osadzie czynnym,
6. Analizę toksyczności odcieków względem badanych kandydatów do bioaugmentacji osadu czynnego,
7. Wybór szczepów bakterii o pożądanych właściwościach i wprowadzenie ich do osadu czynnego obciążonego odciekami ze stawu Kalina,
8. Ocenę wpływu inokulowanych bakterii na efektywność procesu oczyszczania ścieków, jakość oczyszczonych ścieków, zmiany żywej biomasy i potencjału funkcjonalnego mikroorganizmów autochtonicznych w osadzie czynnym.

I.3. Materiały i metody

W badaniach wykorzystano odcieki pochodzące z osadów zalegających na dnie stawu Kalina w Świętochłowicach. Próbkę osadów dennych ze zbiornika pobrano zgodnie z normami: EN ISO 566-13:2011 i EN ISO 19458:2007P, w odległości 2 m od brzegu i z głębokości 2 m z miejsca, w którym odcieki z hałdy odpadów poprodukcyjnych Zakładów Chemicznych Hajduki S.A. przedostawały się do stawu. Próbkę pobierano w okresie od kwietnia 2017 roku do czerwca 2018 roku, po zakończeniu procesu rewitalizacji stawu Kalina. Analizy składu fizykochemicznego wód odciekowych pozyskanych z pobranych osadów dennych przeprowadzono zgodnie z następującymi polskimi normami: PN-ISO 10390:1997, PN-ISO 7150:1-2002, PN-ISO 6439:1994, PN-C-04576-4:1994, PN-82/C-04576/08 i PN-73/C-04576/06. Dodatkowo wartość krótkotrwałego biochemicznego zapotrzebowania tlenu (BZT_{st}) określono na podstawie metody respirometrycznej [Hagman i Jansen, 2007]. Oznaczenie wybranych grup mikroorganizmów psychrofilnych w wodach odciekowych wykonano zgodnie z normą EN ISO 8199:2010. Liczebność bakterii z grupy coli, w tym bakterii fekalnych, określono za pomocą referencyjnej metody filtracji membranowej zgodnie z normą EN ISO 9308-1:2014-12/A1:2017-04 na agarze z laktozą, chlorkiem trójfenylotetrazoliowym (TTC) i Tergitolem 7 oraz podłożu m-Endo LES.

Osad czynny wykorzystany w badaniach pozyskano z komory nityfikacyjnej oczyszczalni ścieków Klimzowiec w Chorzowie. Następnie osad aklimatyzowano w warunkach laboratoryjnych w sekwencyjnych reaktorach porcjowych (SBR) do ścieków syntetycznych przez okres trzech tygodni [Michalska i in., 2016]. W celu zbadania toksyczności odcieków ze stawu Kalina przeprowadzono test inhibicji wzrostu mikroorganizmów autochtonicznych osadu czynnego z wykorzystaniem płytek mikrotitracyjnych. W tym celu zawiesinę mikroorganizmów heterotroficznych o masie 0,1 g/l (50 μ l), pozyskanych z osadu czynnego na drodze ekstrakcji z użyciem metody homogenizacji, wprowadzono do dołków płytki mikrotitracyjnej zawierających 250 μ l mieszaniny ścieków syntetycznych z odciekami, których stężenie wynosiło od 0 do 12,5%. Skład ścieków syntetycznych był zbliżony do ścieków komunalnych odprowadzanych do oczyszczalni ścieków Klimzowiec i został opisany w pracy Michalskiej i in. [2019]. Po 24 godzinach inkubacji z wytrząsaniem w temperaturze $23 \pm 2^\circ\text{C}$ mierzono wzrost mikroorganizmów, określając stężenie ich biomasy. Wartości NIC (*ang. non-inhibitory concentration*), EC_{50} (*ang. half maximal effective concentration*) i MIC_{100} (*ang. minimal inhibitory concentration, which completely inhibit the microbial growth*) wyznaczono za pomocą oprogramowania GraphPad PRISM 6.05, w którym wykonano modelowanie krzywej inhibicji wzrostu mikroorganizmów.

Badania chronicznego wpływu odcieków ze stawu Kalina w stężeniach 3,5 i 5,5% na stan osadu czynnego i proces oczyszczania ścieków prowadzono w reaktorach typu SBR, które pełnią wszystkie funkcje konwencjonalnej biologicznej oczyszczalni ścieków, opartej na technologii osadu czynnego. Układ doświadczalny oraz etapy prowadzonych badań przedstawiono na rys. 1A, natomiast stosowane techniki badawcze szczegółowo opisano w pracy Michalskiej i in. [2019], stanowiącej rozdział II.3 niniejszej rozprawy doktorskiej. Wpływ odcieków na wybrane parametry operacyjne procesu oczyszczania ścieków analizowano w oparciu o pomiar zmian ChZT, zawartości zawiesin w komorze osadu czynnego, w tym zawiesin lotnych (*ang. MVLSS, mixed liquor volatile suspended solids*), pH oraz indeksu opadowego osadu czynnego (IO) [APHA, 1999]. W trakcie procesu współoczyszczania odcieków wraz ze ściekami określano zmiany liczebności mikroorganizmów heterotroficznych pozyskanych z osadu czynnego, hodując je na agarze odżywczym zgodnie z EN ISO 8199:2010. Ponadto w trakcie badań mierzono aktywność kluczowych enzymów zaangażowanych w proces mikrobiologicznego rozkładu zanieczyszczeń w ściekach, tj. dehydrogenaz (EC. 1.1.1) [Miksch, 1977] i niespecyficznych esteraz (EC. 3.1) [Schumacher et al., 2015].



Rys. 1. Etapy prowadzonych badań. A – badanie wpływu odcieków na oczyszczanie ścieków metodą osadu czynnego, B – charakterystyka badanych szczepów bakteryjnych, C – bioaugmentacja osadu czynnego obciążonego odciekami z użyciem wyselekcjonowanych szczepów bakterii.

Zmiany potencjału funkcjonalnego populacji mikroorganizmów osadu czynnego obciążonego odciekami monitorowano przy użyciu metody BIOLOG[®]EcoPlate[™], która opiera się na analizie profili metabolizowania łatwo przyswajanych źródeł węgla przez zespoły mikroorganizmów (*ang. CLPPs, community-level physiological profiles*). Uzyskane dane empiryczne wzrostu zespołów

mikroorganizmów w obecności poszczególnych substratów zostały dopasowane do modelu krzywej logistycznej Verhulsta za pomocą algorytmu Levenberga-Marquadta [Peleg i in., 2007]. Modelowanie danych empirycznych wzrostu populacji mikroorganizmów oraz wyznaczenie parametrów kinetycznych równania wzrostu i wskaźników różnorodności funkcjonalnej opisano szczegółowo w pracy **Michalskiej i in. [2019]**, stanowiącej rozdział **II.3** niniejszej rozprawy doktorskiej. Działanie to pozwoliło na określenie czasu, w którym badana populacja mikroorganizmów osiągała najwyższą ogólną aktywność metaboliczną. Stworzyło to możliwość porównania z dużo większą dokładnością zespołów mikroorganizmów w próbkach osadu czynnego pobranych w różnych czasie. W celu monitorowania zmian strukturalnych zachodzących w populacji mikroorganizmów wykorzystano analizę metylowych estrów kwasów tłuszczowych (*ang. FAMES, fatty acid methyl esters*) izolowanych bezpośrednio z osadu czynnego, poddanego uprzednio homogenizacji. FAMES ekstrahowano z próbek osadu czynnego zgodnie z procedurą opisaną przez Kozdrója [2000] i identyfikowano z wykorzystaniem oprogramowania MIDI-MIS (*ang. Microbial Identification System*). Na podstawie analizy uzyskanych profili FAMES określono podobieństwa między strukturami zespołów mikroorganizmów przy użyciu wskaźnika różnorodności Shannona-Wienera [Nowak i Mroziak, 2018] i indeksu podobieństwa (*ang. SIM, similarity index*) [Son i Hall, 2003]. Na zakończenie tego etapu badań analizowano strukturę kłaczków osadu czynnego z wykorzystaniem mikroskopii jasnego pola oraz mikroskopii fluorescencyjnej, poddając kłaczkowi osadu barwieniu oranżem akrydyny.

W celu doboru odpowiednich mikroorganizmów do inokulacji osadu czynnego obciążonego odciekami ze stawu Kalina, 10 szczepów bakteryjnych zbadano i oceniono pod kątem ich potencjału degradacyjnego, zdolności do wzrostu w obecności odcieków, wspomaganie rozkładu zanieczyszczeń w ściekach i wbudowywania się w strukturę kłaczków osadu czynnego. Dwa szczepy *Pseudomonas* sp. (VTT E-93486) i *Pseudomonas putida* mt-2 (VTT E-022150) pozyskano z kolekcji VTT (Espoo, Finlandia), natomiast szczep *Pseudomonas fluorescens* (PCM 2123) otrzymano z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu. Kolejne trzy szczepy *Planococcus* sp. S5, *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 i *Pseudomonas putida* pochodziły z kolekcji mikroorganizmów Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Wydziału Nauk Przyrodniczych, Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Pozostałe cztery szczepy *Pseudomonas putida* KB3 i *Rhodococcus erythropolis* KB4 oraz *Pseudomonas putida* OR45a i *Glutamicibacter soli* OR45b wyizolowano odpowiednio z wolnego od zanieczyszczeń użytku rolnego (Siewierz) oraz z osadu czynnego obciążonego ściekami z przemysłu rafineryjnego (Jedlicze) [Michalska i in., 2020a]. Wyizolowane szczepy zidentyfikowano do gatunków za pomocą metody 16S rDNA [Marchlewicz i in., 2016]. Otrzymane sekwencje genu 16S rDNA dla szczepu *Pseudomonas putida* KB3, *Rhodococcus erythropolis* KB4, *Pseudomonas putida* OR45a i *Glutamicibacter soli* OR45b zostały zdeponowane w bazie danych GenBank pod następującymi numerami akcesyjnymi: KU299960, KU299961, MN508083 i MN508084. Analizę cech funkcjonalnych badanych szczepów przedstawiono na rys. 1B, natomiast stosowane techniki badawcze szczegółowo opisano w pracy **Michalskiej i in. [2020a]**, stanowiącej rozdział **II.4** niniejszej rozprawy doktorskiej.

Potencjał degradacyjny 10 wybranych szczepów bakteryjnych w kierunku rozkładu następujących związków aromatycznych: fenolu, 2-metylofenolu, 3-metylofenolu, 4-metylofenolu, mieszaniny krezoli, kwasu 4-hydroksybenzoesowego, kwasu 2,3-dihydroksybenzoesowego i katecholu w zakresie stężeń od 250 do 1000 µg/l oraz 4-aminofenolu w zakresie stężeń od 25 do 100 µg/l oceniano z zastosowaniem płytek mikrotitracyjnych BIOLOG[®]TM. Natomiast zdolność testowanych szczepów do wzrostu w obecności wód odciekowych w stężeniu od 0 do 12,5% i wybranych jonów: Cu²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Ba²⁺, Cr⁶⁺ i Pb²⁺ w stężeniu od 0 do 300 µg/ml oraz NH₄⁺ w stężeniu od 0 do 2000 µg/ml badano z wykorzystaniem testu inhibicji wzrostu na płytkach mikrotitracyjnych. Następnie określano potencjał bakterii do wbudowywania się w strukturę kłaczków osadu czynnego na podstawie oceny ich zdolności do autoagregacji i koagregacji z mikroorganizmami autochtonicznymi osadu, bioflokulacji,

wytwarzania substancji egzopolisacharydowych (EPS), a także do komunikowania się ze sobą (quorum sensing) poprzez wydzielanie do otoczenia i rozpoznawanie autoinduktorów [Michalska i in., 2020a]. Właściwości autoagregacyjne i koagregacyjne potencjalnych kandydatów do bioaugmentacji badano z użyciem zmodyfikowanej metody opisanej przez Malik i in. [2003], wyznaczając wskaźniki autoagregacji (AAI) i koagregacji (CAI). Aktywność flokulacyjną mikroorganizmów określano przez spektrofotometryczny pomiar absorbancji ($\lambda = 550$ nm) zawiesiny kaolinowej zawierającej bezwodny chlorek wapnia oraz zawiesinę bakterii [Kurane i in., 1994; Zhang i in., 2007]. Oceny zdolności bakterii do wytwarzania EPS dokonano na podstawie koloru przyjmowanego przez kolonie, które hodowano na stałym podłożu agarowym z dodatkiem czerwieni Kongo (agar CRA). Bakterie, których kolonie przyjmowały na agarze CRA kolor czerwono-czarny o krystalicznej konsystencji uznawano za potencjalnie zdolne do wytwarzania EPS [Freeman i in., 1989]. Zdolność do quorum sensing określano jedynie dla bakterii Gram-ujemnych na podstawie ich predyspozycji do wytwarzania cząsteczek sygnałowych laktonu N-acylo-L-homoseryny (N-AHL), stosując metodę kolorymetryczną opisaną przez Taghadosi i in. [2015]. Szczepy bakteryjne badano także pod kątem wspomaganego usuwania zanieczyszczeń w ściekach na podstawie ich zdolności do produkcji biosurfaktantów i sideroforów. Zdolność bakterii do wydzielania biosurfaktantów badano na podstawie ich wzrostu na pożywce mineralnej zestawionej agarom z dodatkiem 0,2 g/l bromku cetylotrimetyloamoniowego (CTAB) i 0,005 g/l błękitu metylenowego [Pacwa-Płociniczak i in., 2016]. Pojawienie się ciemnoniebieskiego halo wokół kolonii bakteryjnych wskazywało na obecność pozakomórkowego, glikolipidowego biosurfaktantu. Dla szczepów, które były zdolne do produkcji biosurfaktantów wyznaczono także indeks emulsyfikacji (E_{24}) [Pacwa-Płociniczak i in., 2014]. Zdolność bakterii do wytwarzania sideroforów oznaczano jakościowo metodą opisaną przez Lakshmanan i in. [2015] na podłożu agarowym zawierającym barwnik wskaźnikowy chromazurol S (agar CAS). Kolonie bakteryjne, wokół których zaobserwowano pojawienie się pomarańczowego halo uznano za zdolne do produkcji sideroforów. Prowadzone badania obejmowały także wyznaczenie hydrofobowości powierzchni komórek bakterii metodą mikrobiologicznej adhezji do węglowodorów [Kos i in., 2003]. Stopień hydrofobowości komórek określano na podstawie gęstości optycznej zawiesiny komórek przed wprowadzeniem *p*-ksylenu i po rozdzieleniu faz. W celu poznania odpowiedzi chemotaktycznej bakterii na obecność odcieków badano ruchliwość komórek bakterii na półstałych płytkach agarowych z dodatkiem wód odciekowych w stężeniach 3,5 i 5,5%, zgodnie z metodą opisaną przez Déziel i in. [2001].

Na podstawie przeprowadzonej charakterystyki wszystkich szczepów, do bioaugmentacji osadu czynnego obciążonego odciekami z osadów dennych stawu Kalina wybrano dwa szczepy - *P. putida* OR45a i *P. putida* KB3. W oddzielnym eksperymencie przeprowadzono sekwencjonowanie całych genomów tych bakterii. Ekstrakcję DNA z komórek bakterii przeprowadzono przy użyciu zestawu GeneMATRIX Bacterial and Yeast Genomic DNA Purification Kit. Sekwencjonowanie genomu przeprowadzono za pomocą MicrobesNG [microbesng.uk] przy użyciu platformy Illumina MiSeq. Wyniki sekwencjonowania analizowano z użyciem MicrobesNG i zdeponowano w bazie danych GenBank pod następującymi numerami akcesyjnymi: SPUU00000000.1 i SPUT00000000.1, odpowiednio dla szczepu *P. putida* OR45a i *P. putida* KB3. Szczegółowe informacje dotyczące analiz genomowych tych szczepów zamieszczono w pracy **Michalskiej i in. [2020a]**, stanowiącej rozdział **II.4** niniejszej rozprawy doktorskiej.

Eksperyment bioaugmentacyjny prowadzono w reaktorach typu SBR obciążonych odciekami ze stawu Kalina w stężeniach: 3,5% (do 32 dnia), 5,5% (od 32 do 64 dnia) oraz 12,5% (od 64 do 96 dnia) w następujących układach badawczych: 1) osad czynny obciążony ściekami syntetycznymi - kontrolny, 2) osad czynny obciążony ściekami syntetycznymi, inokulowany szczepem OR45a, 3) osad czynny obciążony ściekami syntetycznymi, inokulowany szczepem KB3, 4) osad czynny obciążony ściekami syntetycznymi, inokulowany konsorcjum szczepów OR45a i KB3, 5) osad czynny obciążony mieszaniną ścieków syntetycznych i odcieków, 6) osad czynny obciążony mieszaniną ścieków syntetycznych i odcieków, inokulowany szczepem OR45a, 7) osad czynny obciążony mieszaniną

ścieków syntetycznych i odcieków, inokulowany szczepem KB3, 8) osad czynny obciążony mieszaniną ścieków syntetycznych i odcieków, inokulowany konsorcjum szczepów OR45a i KB3.

Wykorzystane do badań bioaugmentacyjnych wody odciekowe zostały dodatkowo wzbogacone mieszaniną wybranych związków fenolowych, aby odzwierciedlić rzeczywiste stężenie fenoli w odciekach ze stawu Kalina, odnotowane w okresie rewitalizacji zbiornika. W tym celu do 1 litra wód odciekowych wprowadzono 327 mg fenolu, 356 mg 3-metylofenolu, 356 mg 4-metylofenolu, 129 mg 3-etylofenolu, 60 mg 2,4-dimetylofenolu, 281 mg 3,4-dimetylofenolu i 292 mg 2,3,5-trimetylofenolu, powodując wzrost stężenia związków fenolowych w odciekach z 200 mg/l do 1700 mg/l. Rodzaje związków fenolowych oraz ich wzajemny stosunek objętościowy pochodziły z pracy Chojniak i in. [2015]. Układ doświadczalny oraz etapy prowadzonych badań przedstawiono na rys. 1C, natomiast stosowane techniki badawcze szczegółowo opisano w pracy Michalskiej i in. [2020b], stanowiącej rozdział II.5 niniejszej rozprawy doktorskiej.

Efektywność oczyszczania ścieków w bioaugmentowanych układach badawczych określano na podstawie zmian ChZT, stężenia związków fenolowych i azotu amonowego w ściekach oraz zawartości zawiesin, wartości indeksu opadowego osadu i pH w dniu założenia eksperymentu, a następnie po 32, 64 i 96 dniach prowadzenia eksperymentu. Stężenie związków fenolowych w ściekach badano zgodnie z normą PN-ISO 6439:1994 z użyciem 4-aminoantypiryny. Ponieważ metoda ta nie pozwalała na oznaczenie związków fenolowych podstawionych w pozycji *para*, stężenie tych związków w ściekach analizowano dodatkowo za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych, w której fazę mobilną stanowiła mieszanina metanolu i 1% kwasu octowego w stosunku objętościowym 50:50 (v/v). Na podstawie pomiaru wybranych parametrów operacyjnych procesu oczyszczania ścieków wyznaczono indeks jakości ścieków oczyszczonych (*ang. WWQI, wastewater quality index*). W czasie trwania eksperymentu, a także w dniu jego zakończenia oceniano wpływ introdukowanych szczepów OR45a i KB3 oraz ich konsorcjum na zmiany aktywności dehydrogenaz [Miksch, 1977], niespecyficznych esteraz [Schumacher i in., 2015] i katalaz [Yan, 1988] oraz liczebność mikroorganizmów heterotroficznych w osadzie czynnym, w tym bakterii zdolnych do wykorzystywania fenolu jako jedyne źródła węgla i energii. Do określenia kondycji osadu czynnego wykorzystano także analizę właściwej szybkości pobierania tlenu (SOUR) [Lim i in., 2013]. Ponadto oceniano zmiany potencjału funkcjonalnego populacji mikroorganizmów bioaugmentowanego osadu czynnego obciążonego odciekami przy użyciu techniki BIOLOG® EcoPlate™ [Michalska i in., 2019]. Natomiast zmiany żywej biomasy w inokulowanym osadzie czynnym monitorowano poprzez pomiar stężenia całkowitego, zawieszonego i wewnątrzkomórkowego ATP z wykorzystaniem zestawu BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability kit [Järvik i in., 2010; Pistelok i in., 2016].

I.4 Wyniki i dyskusja

I.4.1 Charakterystyka fizykochemiczna i mikrobiologiczna odcieków ze stawu Kalina oraz analiza ich wpływu na oczyszczanie ścieków metodą osadu czynnego

W pierwszym etapie pracy badawczej dokonano fizykochemicznej i mikrobiologicznej charakterystyki odcieków pochodzących z osadów dennych stawu Kalina oraz oceniono ich toksyczność względem mikroorganizmów autochtonicznych obecnych w osadzie czynnym. Pobrane do badań odcieki były mętne, miały zabarwienie czarne i zapach specyficzny dla związków fenolowych oraz charakteryzowały się silnie alkalicznym odczynem pH (9,0). Wśród wielu parametrów, które umożliwiają ocenę zmian składu jakościowego wód odciekowych, wartość pH jest uważana za wskaźnik stopnia jego agresywności [El-Fadel i in., 2017]. Ze względu na silnie alkaliczny odczyn można uznać, że odcieki ze stawu Kalina pochodziły ze starego i ustabilizowanego składowiska odpadów. W badanych wodach odciekowych stężenie związków organicznych wyrażonych jako ChZT wynosiło 2510 mg O₂/l, podczas gdy stężenie związków ulegających biologicznej degradacji wyrażone jako BZT_{st} wynosiło jedynie 13 mg O₂/l. Główne źródło azotu w odciekach stanowił N-NH₄⁺ (399 mg/l), natomiast zawartość N-NH₂⁻ i N-NH₃ była stosunkowo niska i wynosiła odpowiednio 0,04 i 2,93 mg/l. Ponadto odcieki charakteryzowały się wysoką zawartością P-PO₄³⁻ (154 mg/l) i były skażone związkami fenolowymi w stężeniu 186 mg/l. Oprócz dużego ładunku zanieczyszczeń chemicznych, odcieki zawierały również znaczną ilość zanieczyszczeń mikrobiologicznych i dlatego zostały uznane jako potencjalne zagrożenie sanitarne i epidemiologiczne dla środowiska. Ogólna liczba heterotroficznych bakterii psychrofilnych w odciekach wynosiła 3,04 · 10⁶ jtk/ml. Wśród nich duży udział miały bakterie nitkowate (5,68 · 10⁵ jtk/ml) i promieniowce (1,25 · 10⁶ jtk/ml). Wody odciekowe były natomiast w mniejszym stopniu zanieczyszczone przez grzyby (5,0 · 10⁶ jtk/ml) i bakterie z grupy coli (1,06 · 10⁴ jtk/ml), w tym bakterie fekalne (6,50 · 10² jtk/ml). Wysoka liczebność bakterii wskaźnikowych w odciekach może być związana ze stwierdzoną w nich znaczną zawartością fosforanów, które mogą stymulować wzrost bakterii chorobotwórczych w wodach odciekowych [Chudoba i in., 2013]. Ponieważ w Polsce brak jest regulacji prawnych normujących dopuszczalne wartości wskaźników zanieczyszczeń oznaczanych w wodach odciekowych, w niniejszej pracy do określenia ogólnego ładunku zanieczyszczeń niesionych przed odcieki wykorzystano indeks zanieczyszczenia odcieku (LPI), zaproponowany przez Kumar i Alappat [2005a]. Wartość LPI dla badanych odcieków określono na podstawie wartości pH, zawartości ChZT, zawiesin ogólnych, N-NH₄⁺ i BZT_{st}, a także stężenia związków fenolowych i liczebności bakterii wskaźnikowych. Wyznaczona dla odcieków wartość indeksu ich zanieczyszczenia (38,280) przekraczała ponad 5-krotnie wartość graniczną LPI dla oczyszczonych wód odciekowych, które mogą być odprowadzane do wód śródlądowych (7,387) oraz 2-8-krotnie wartości LPI oznaczone w odciekach pochodzących ze składowisk krajowych (4 - 18) [Kumar i Alappat, 2005b; Szymańska-Pulikowska, 2010]. Analiza potencjału funkcjonalnego zespołów mikroorganizmów obecnych w odciekach z wykorzystaniem systemu Biolog[®]EcoPlate[™] wykazała, że były one zdolne do przeżycia w obecności zanieczyszczeń występujących w wodach odciekowych, jednak nie wykorzystywały ich jako źródeł węgla i energii. Mikroorganizmy autochtoniczne charakteryzowały się słabą aktywnością metaboliczną, o czym świadczyła wartość wskaźnika maksymalnej aktywności mikrobiologicznej (A_{max}) na poziomie 0,4 i wartość wskaźnika bogactwa metabolicznego (S) na poziomie 6,00. Bakterie obecne w odciekach były zdolne do utylizacji zaledwie 20% spośród 30 substratów wzrostowych dostępnych w systemie Biolog[®]EcoPlate[™], wykorzystując jako źródła węgla i energii jedynie wybrane kwasy karboksylowe (np. kwas 4-hydroksybenzoesowy), surfaktanty, glikogen i L-asparaginę.

Przeważająca większość biologicznych oczyszczalni ścieków w Polsce stosuje system wspólnego oczyszczania odcieków ze składowisk odpadów ze ściekami komunalnymi, oparty na technologii osadu czynnego [Liwarska-Bizukoje in., 2019; Piotrowski i in., 2019]. Toksyczność poszczególnych ksenobiotyków w stosunku do mikroorganizmów autochtonicznych obecnych w

osadzie czynnym zależy w dużej mierze od ich budowy i właściwości fizykochemicznych. Natomiast toksyczność odcieków jest wynikiem synergistycznego lub antagonistycznego oddziaływania różnych zanieczyszczeń [Kalka, 2012]. Dane literaturowe wskazują, że przeprowadzone dotychczas badania toksyczności odcieków względem mikroorganizmów obejmowały wyłącznie wpływ wód odciekowych na pojedyncze szczepy bakterii, wchodzące w skład komercyjnie dostępnych testów [Matejczyk in., 2011; Kalka, 2012]. W ramach niniejszej pracy doktorskiej ocenę toksyczności odcieków ze stawu Kalina przeprowadzono względem mikroorganizmów autochtonicznych obecnych w osadzie czynnym, pochodzącym z oczyszczalni ścieków Klimzowiec. Według danych udostępnionych przez oczyszczalnię udział procentowy odcieków ze stawu Kalina w surowych ściekach komunalnych wynosi 1,5% w porze suchej i 5,5% w porze deszczowej. Dane literaturowe wskazują także, że rzeczywisty stosunek objętościowy odcieków do ścieków komunalnych dla większości oczyszczalni ścieków nie przekracza stosunku 10:90 (v/v) [Kalka, 2012; Campos i in., 2014; Faudala-Książek i in., 2014]. Na podstawie tych informacji w ocenie toksyczności wód odciekowych ze stawu Kalina wzięto pod uwagę zależność między różnymi stężeniami odcieków w ściekach syntetycznych (od 0 do 12,5%) a wzrostem testowanych mikroorganizmów autochtonicznych [Michalska i in., 2019]. Zastosowanie w badaniach ścieków syntetycznych było podyktowane koniecznością wyeliminowania wpływu ewentualnych zmian składu rzeczywistych ścieków komunalnych na wyniki prowadzonych eksperymentów. Na podstawie wyników uzyskanych w teście hamowania wzrostu mikroorganizmów z wykorzystaniem płytek mikrotitracyjnych, efektu toksycznego odcieków nie stwierdzono, gdy ich udział procentowy w ściekach syntetycznych wynosił mniej niż 3,45% (wartość NIC). Zahamowanie wzrostu 50% populacji mikroorganizmów nastąpiło natomiast w obecności 6,69% odcieków (wartość EC_{50}). Ekspozycja mikroorganizmów autochtonicznych osadu czynnego na działanie 11,26% odcieków spowodowała całkowite zahamowanie ich wzrostu (wartość MIC_{100}).

W dalszych badaniach analizowano wpływ długotrwałej obecności 3,5%, a następnie 5,5% odcieków w ściekach na parametry operacyjne procesu oczyszczania ścieków syntetycznych. Badania wykazały stopniowy spadek efektywności usuwania ChZT w reaktorze typu SBR obciążonym odciekami, których procentowy udział w ściekach wynosił 3,5% a następnie 5,5%, odpowiednio z 95% do 69%, a następnie do 41%. Dla porównania wydajność procesu oczyszczania ścieków w bioreaktorze kontrolnym utrzymywała się na poziomie od 83% do 96%. Podobne zjawisko obserwowali De Albuquerque i in. [2018], którzy stwierdzili obniżenie efektywności usuwania zanieczyszczeń organicznych z 90% do 70%, a następnie do 50% w bioreaktorze obciążonym odciekami ze składowiska odpadów w São Carlos (Brazylia), w stężeniach odpowiednio 2% i 5%. Fluktuacjom składu chemicznego ścieków, związanym z odprowadzaniem odcieków do oczyszczalni, mogą towarzyszyć zmiany parametrów operacyjnych procesu biologicznego oczyszczania ścieków, takich jak: temperatura, odczyn, zasolenie oraz zawartość tlenu rozpuszczonego [Sipma i in., 2010]. Utrzymanie optymalnego pH (6,5 - 8,0) w komorze osadu czynnego w trakcie procesu oczyszczania ścieków ma kluczowe znaczenie dla stabilnej pracy oczyszczalni, ponieważ wpływa ono na spoistość, wytrzymałość i ładunek powierzchniowy kłaczków osadu oraz odgrywa ważną rolę w prawidłowym rozwoju mikroorganizmów autochtonicznych. W związku z tym gwałtowne zmiany odczynu ścieków mogą powodować uszkodzenie struktury zewnętrznej kłaczków osadu oraz spadek aktywności mikroorganizmów autochtonicznych, zmniejszenie ich bioróżnorodności i zahamowanie wzrostu, co może prowadzić do pogorszenia się kondycji osadu czynnego, a w konsekwencji do obniżenia efektywności procesu oczyszczania ścieków [Chong i in., 1997; Saraswathi i Saseetharan, 2010]. Ponadto wartość tego wskaźnika wpływa na skuteczność biodegradacji zanieczyszczeń w ściekach, m.in. fenolu i jego pochodnych [Duan, 2011; Cozma i in., 2012]. Badania wykazały, że obecność wód odciekowych w ściekach wpłynęła na wzrost wartości pH w bioreaktorze obciążonym 3,5% odciekami z 7,6 do 8,1. Ponadto wraz ze wzrostem udziału procentowego odcieków w ściekach z 3,5% do 5,5% obserwowano dalszy wzrost wartości tego parametru do 9,3. Zmiany pH w bioreaktorze obciążonym odciekami były skorelowane z pogorszeniem się właściwości sedymentacyjnych osadu czynnego, o

czym świadczyła niska wartość indeksu opadowego (IO), na poziomie 53 cm³/g, oznaczona w końcowym dniu eksperymentu. Podobnie Ghanizadeh i Sarrafpour [2001] wykazali, że wzrost pH ścieków z 5,7 do 9,0 przyczynił się do znacznego obniżenia IO osadu czynnego z 96 do 44 cm³/g. Badania prowadzone w ramach tej pracy doktorskiej wykazały także, że zmiany IO osadu czynnego obciążonego odciekami były związane z ich udziałem procentowym w ściekach. Podobne obserwacje poczynili Pieczykolan i in. [2016] oraz Ranjan i in. [2016], którzy odnotowali znaczący spadek wartości IO z 90 i 80 cm³/g do 30 i 20 cm³/g wraz ze wzrostem stężenia odcieków ze składowisk odpadów komunalnych w ściekach, odpowiednio z 2,5% do 15% i 40%. Ponieważ indeks opadowy osadu czynnego dostarcza informacji o ogólnej kondycji osadu czynnego, niska wartość tego parametru (poniżej 70 cm³/g) dla bioreaktora obciążonego odciekami ze stawu Kalina może świadczyć o dominacji w osadzie czynnym silnie rozdrobnionych kłaczków typu pinpoint. Analizy mikroskopowe potwierdziły zmiany morfologiczne kłaczków w osadzie czynnym obciążonym odciekami, które były mniejsze, bardziej rozproszone i mniej regularne niż w osadzie kontrolnym, oczyszczającym jedynie ścieki syntetyczne. Podobnie stopniowy wzrost ilości małych kłaczków w osadzie czynnym wraz ze wzrostem jego obciążenia odciekami w zakresie od 2,5% do 15% obserwowali Pieczykolan i in. [2016].

Monitorowanie zmian zawartości zawiesin ogólnych (MLSS), w tym zawiesin lotnych (MVLSS), jest kluczowe dla prawidłowego przebiegu procesu oczyszczania ścieków, ponieważ ich stosunek odzwierciedla stężenie biomasy w osadzie czynnym. Uważa się, że utrzymanie wartości MLSS w reaktorze typu SBR na poziomie od 2,5 do 5,0 mg/l pozwala na osiągnięcie pożądanego stężenia mikroorganizmów w osadzie czynnym [Artan i Orhon, 2005]. Wyniki badań wskazały, że obecność odcieków ze stawu Kalina w osadzie czynnym przyczyniła się do obniżenia stosunku MLVSS do MLSS z 0.83 do 0.69. Po 64 dniach prowadzenia eksperymentu zawartość MVLSS w bioreaktorze stanowiła około 63% MLSS i była zbyt niska, aby możliwe było osiągnięcie efektywnego usunięcia zanieczyszczeń w ściekach [Wang i in., 2010]. Jednocześnie obniżenie wartości stosunku MLVSS do MLSS w bioreaktorze obciążonym odciekami było skorelowane ze spadkiem liczebności mikroorganizmów heterotroficznych w tym środowisku o 28% w stosunku do ich liczebności w osadzie kontrolnym, w którym oczyszczano jedynie ścieki syntetyczne. Na tej podstawie można wnioskować, że związki chemiczne obecne w odciekach ze stawu Kalina miały wpływ na wzrost mikroorganizmów osadu czynnego, lecz ich obecność ograniczyła lub zahamowała wykorzystanie łatwo dostępnych w ściekach źródeł węgla i energii [Çeçen i Tezel, 2018]. Wnioski te potwierdzają wyniki badań dotyczących zmian różnorodności funkcjonalnej zespołów mikroorganizmów zasiedlających osad czynny obciążony odciekami z zastosowaniem systemu BIOLOG®. Analiza wykorzystania łatwo przyswajanych źródeł węgla na płytkach EcoPlate™ wykazała utratę zdolności mikroorganizmów autochtonicznych osadu czynnego do metabolizowania 33%, a następnie 40% źródeł węgla, gdy w bioreaktorze oczyszczane były ścieki syntetyczne o wzrastającym udziale procentowym odcieków, odpowiednio z 3,5% do 5,5%. Z kolei bakterie występujące w bioreaktorze kontrolnym były zdolne do wykorzystania substancji obecnych w ściekach syntetycznych, co przyczyniło się do wzrostu MVLSS i MLSS w tym układzie. W porównaniu z mikroorganizmami nienarażonymi na działanie wód odciekowych, bakterie występujące w osadzie czynnym obciążonym odciekami preferencyjnie metabolizowały przede wszystkim dostępne na płytkach EcoPlate™ węglowodany i związki fenolowe. Ponadto zwiększenie udziału procentowego odcieków w ściekach syntetycznych wpłynęło na metabolizm kwasów karboksylowych, surfaktantów i polimerów, powodując obniżenie intensywności ich utylizowania, odpowiednio z 19,4% do 7,8%, z 7,3% do 4,6% i z 7,5% do 4,0%. Porównując mikroorganizmy z bioreaktora kontrolnego oraz obciążonego wodami odciekowymi pod względem ich zdolności do wykorzystywania źródeł azotu i fosforu stwierdzono, że bakterie narażone na działanie odcieków w większym stopniu wykorzystywały związki zawierające azot, lecz nie potrafiły metabolizować związków zawierających fosfor. Obserwowane w kolejnych tygodniach różnice pomiędzy profilami metabolicznymi uzyskanymi dla osadu czynnego oczyszczającego jedynie ścieki syntetyczne i współoczyszczającego ścieki z odciekami mogą świadczyć o metabolicznym

wyspecjalizowaniu się mikroorganizmów w skażonym środowisku. Wpływ odcieków ze składowisk odpadów na różnorodność funkcjonalną zespołów mikroorganizmów autochtonicznych występujących w osadzie czynnym jest stosunkowo słabo udokumentowany w literaturze. W badaniach przeprowadzonych przez Röling i in. [2000] wykazano, że spośród 30 substratów wzrostowych dostępnych na płytce EcoPlate™ zespoły mikroorganizmów występujących w warstwie wodonośnej zanieczyszczonej odciekami ze składowiska odpadów w Banisveld (Boxtel, Holandia) preferencyjnie metabolizowały przede wszystkim związki aromatyczne. Z badań Taş i in. [2018] wynika natomiast, że w wodach gruntowych zanieczyszczonych wspomnianymi odciekami nastąpił znaczny wzrost liczby genów kodujących białka zaangażowane w metabolizm węglowodanów i związków fenolowych.

Aktywność enzymatyczna i metaboliczna mikroorganizmów autochtonicznych występujących w osadzie czynnym stanowią kluczowe wskaźniki do oceny ich zdolności do rozkładu związków chemicznych zawartych w ściekach [Griebe i in., 1997; Oviedo i in., 2009; Xia i in., 2018]. Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej wskazują, że wprowadzenie wód odciekowych ze stawu Kalina do ścieków znacząco wpłynęło na obniżenie aktywności dehydrogenaz i niespecyficznego esteraż w osadzie czynnym, odpowiednio o 70% i 33%. Ponieważ aktywność badanych enzymów w osadzie czynnym stale spadała w trakcie prowadzenia eksperymentu, można wnioskować, że obecność wód odciekowych w ściekach stanowiła czynnik stresowy dla mikroorganizmów autochtonicznych, do którego nie potrafiły się zaadaptować. Wpływ różnych stężeń odcieków ze składowisk odpadów na aktywność dehydrogenaz w osadzie czynnym analizowali także Li i Zhao [1999] oraz Grosser i in. [2018]. Wyniki badań tych autorów wskazały na znaczący spadek aktywności oddechowej mikroorganizmów wraz ze wzrostem procentowego udziału odcieków w mieszaninie ze ściekami syntetycznymi powyżej 15%.

Chociaż aktywność enzymatyczna i metaboliczna mikroorganizmów w osadzie czynnym jest niezwykle ważna dla prawidłowego funkcjonowania tego ekosystemu, analiza tych parametrów bardzo rzadko jest brana pod uwagę podczas oceny wpływu odcieków na funkcjonowanie oczyszczalni ścieków. Wyniki badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej wykazały, że mikroorganizmy w osadzie czynnym obciążonym odciekami były zdecydowanie mniej aktywne niż bakterie w środowisku niepoddanym działaniu wód odciekowych, o czym świadczą niższe wartości indeksu różnorodności Shannona-Wienera (H'_{ECO}), bogactwa metabolicznego (S) i maksymalnej aktywności mikrobiologicznej (A_{max}), odpowiednio o 37%, 63% i 48%. Niska aktywność metaboliczna w osadzie czynnym obciążonym odciekami była skorelowana z utratą zdolności mikroorganizmów autochtonicznych do utylizowania określonych substratów wzrostowych (m.in. związków zawierających fosfor) oraz ze wzrostem wykorzystania związków fenolowych i zawierających azot. Obniżenie różnorodności funkcjonalnej zespołów mikroorganizmów w osadzie czynnym może wskazywać na spadek liczebności grup mikroorganizmów istotnych dla procesu oczyszczania ścieków, m.in. bakterii zdolnych do solubilizacji fosforanów, które mogły zostać wyparte przez gatunki mikroorganizmów pochodzące z odcieków.

Do monitorowania zmian strukturalnych zachodzących w populacji mikroorganizmów osadu czynnego w czasie prowadzonego eksperymentu wykorzystano metodę FAMEs. Analiza uzyskanych profili FAMEs wykazała, że mikroorganizmy autochtoniczne osadu czynnego były bardzo wrażliwe na zanieczyszczenia obecne w odciekach i wykazywały mechanizmy adaptacji do obecności wód odciekowych w ściekach syntetycznych. Zasadnicze zmiany w profilach FAMEs dotyczyły wzrostu zawartości kwasów 16:0, 3-hydroksy i 15:0 *anteiso*, odpowiedzialnych za usztywnienie struktury błony bakteryjnej. W odpowiedzi na wzrost udziału procentowego odcieków w ściekach zaobserwowano także stopniowy wzrost udziału kwasów rozgałęzionych i cyklopropanowych, odpowiedzialnych za usztywnienie błony bakteryjnej i obniżenie jej przepuszczalności [Murínová i Dercová, 2014]. Natomiast wzrost udziału kwasów rozgałęzionych o izomerii *anteiso* w stosunku do kwasów o izomerii *iso* może być wynikiem odpowiedzi mikroorganizmów autochtonicznych w osadzie czynnym na stres pH, wynikający z obecności odcieków w ściekach [Giotis i in., 2007]. W niniejszej pracy uzyskano

interesujące wyniki dotyczące udziału poszczególnych grup mikroorganizmów w osadzie czynnym w trakcie procesu współczyszczania ścieków z odciekami. Pomimo przewagi bakterii Gram-ujemnych w bioreaktorze kontrolnym oraz obciążonym odciekami, w trakcie prowadzenia eksperymentu obserwowano stopniowe zmniejszanie się udziału procentowego biomarkerów charakterystycznych dla tej grupy mikrobiologicznej przy jednoczesnym wzroście zawartości markerów FAME dla bakterii Gram-dodatnich. Wyniki tej części badań opublikowano w pracy Michalskiej i in. [2019], która stanowi rozdział II.3 niniejszej rozprawy.

I.4.2 Charakterystyka wybranych szczepów bakteryjnych pod kątem ich przydatności do bioaugmentacji osadu czynnego obciążonego odciekami ze stawu Kalina

Drugi etap badań obejmował ocenę przydatności 10 szczepów bakteryjnych do bioaugmentacji osadu czynnego obciążonego odciekami ze stawu Kalina. Ponieważ dane literaturowe wskazują, że zbiornik ten zanieczyszczony jest w dużej mierze związkami fenolowymi [Tkaczyk i in., 2005; Wrześniak i Kopyczok, 2012; Chojniak i in., 2015], w badaniach oceniano zdolność wybranych bakterii do wykorzystywania fenolu, 2-metylofenolu, 3-metylofenolu, 4-metylofenolu, mieszaniny krezoli, kwasu 4-hydroksybenzoesowego, kwasu 2,3-dihydroksybenzoesowego i katecholu oraz 4-aminofenolu jako źródeł węgla i energii. Stwierdzono, że najwyższym potencjałem degradacyjnym charakteryzowały się szczepy: *P. putida* OR45a, *P. putida* KB3, *P. putida* N6 i *S. maltophilia* KB3, które były zdolne do wzrostu w obecności wysokich stężeń katecholu, benzoenu, kwasu 4-hydroksybenzoesowego, kwasu 3,4-dihydroksybenzoesowego, fenolu, 2-metylofenolu, 4-metylofenolu oraz mieszaniny krezoli. Rozkład mikrobiologiczny tych związków jest możliwy dzięki aktywności zależnych od żelaza enzymów z klasy oksydaz, które są odpowiedzialne za rozszczepienie pierścienia aromatycznego. Działanie tych enzymów może być wspomagane poprzez wydzielanie związków zwanych sideroforami, które zwiększają biodostępność jonów żelaza (Fe^{3+}) dla komórek bakterii z trudno rozpuszczalnych substratów i środowisk o niskim stężeniu tego pierwiastka [Joshi i in., 2014]. Dane literaturowe wskazują ponadto, że produkcja sideroforów może również pozytywnie wpływać na ruchliwość bakterii, a także wspomagać ich odporność na stres oksydacyjny i stres będący wynikiem obecności związków aromatycznych [Li i in., 2019]. Zdolność do produkcji sideroforów potwierdzono u trzech szczepów: *P. putida* OR45a, *P. putida* KB3 i *S. maltophilia* KB3, zdolnych do wzrostu w obecności wysokich stężeń odcieków ze stawu Kalina.

Autoagregacja i koagregacja między genetycznie identycznymi i odległymi bakteriami odgrywają kluczową rolę w tworzeniu kłaczków osadu czynnego, które chronią mikroorganizmy przed wnikaniem toksycznych związków chemicznych do ich komórek [Malik i in., 2003; Liu i in., 2015]. W związku z tym poszukiwanie bakterii posiadających takie cechy może mieć istotne znaczenie dla osiągnięcia efektywnej bioaugmentacji osadu czynnego [Cheng i in., 2014]. Potwierdzają to badania Jiang i in. [2006], którzy zaobserwowali przyspieszenie rozkładu fenolu i poprawę granulacji w osadzie czynnym po jego inokulacji szczepem *Propioniferax-like* PG-02 zdolnym do rozkładu fenolu oraz szczepem *Comamonas* sp. PB-08 wykazującym właściwości agregacyjne. Podobną kooperację między szczepami *Rhodococcus* sp. YYL, *Bacillus cereus* MLY1 i *Bacillus aquimaris* MLY2, introdukowanymi do osadu czynnego skażonego tetrahydrofuranem, zaobserwowali także Yao i in. [2013]. Z kolei badania przeprowadzone przez Adav i in. [2008] oraz Di Gioia [2004] wykazały, że dzięki zdolnościom agregacyjnym mikroorganizmy o niskim potencjale degradacyjnym mogą wspomagać rozkład zanieczyszczeń w osadzie czynnym prowadzony przez inne introdukowane do niego szczepy bakteryjne. Wyniki badań zrealizowanych w ramach niniejszej rozprawy potwierdziły dobre zdolności autoagregacyjne szczepów *P. putida* OR45a i *P. putida* KB3, odznaczających się jednocześnie wysokim potencjałem degradacyjnym w kierunku rozkładu fenolu oraz szczepów *G. soli* OR45b i *Pseudomonas* sp., które nie były zdolne do wykorzystywania tego związku jako źródła węgla. Wszystkie te bakterie wykazywały ponadto dobrą lub silną zdolność do koagregacji z mikroorganizmami autochtonicznymi osadu czynnego.

Ważną cechą bakterii przeznaczonych do bioaugmentacji osadu czynnego jest ich zdolność do syntezy związków zwanych bioflokulantami, które wspierają agregację komórek i unieruchomienie

zanieczyszczeń zawieszonych w ściekach. Wprowadzenie takich mikroorganizmów do bioreaktora może przyspieszyć proces granulacji osadu i wspomóc tworzenie bardziej stabilnych kłaczków. Takie zjawisko obserwowali Song i in. [2013], którzy bioaugmentowali osad czynny z użyciem konsorcjum bakteryjnego złożonego ze szczepów *Devosia hwasunensis* i *Tetrasphera elongata*, produkujących bioflokulanty. W innych badaniach Guo i in. [2010] wykazali, że synteza bioflokulantów przez *Bacillus* sp. F2 i *Bacillus* sp. F6 przyczyniła się do wzrostu bakterii odpowiedzialnych za spójność kłaczków osadu i poprawę jego flokulacji. Produkcja bioflokulantów przez bakterie może także wspomagać usuwanie różnych zanieczyszczeń w ściekach [Tawila i in., 2018; Gomaa i El-Meihy, 2019]. Oceniając zdolność badanych szczepów bakteryjnych do produkcji bioflokulantów stwierdzono, że jedynie szczepy *R. erythropolis* KB4 i *P. putida* N6 nie posiadały lub miały słabe właściwości bioflokulacyjne (<20%), natomiast pozostałe badane bakterie charakteryzowały się dobrą (39% do 49%) lub silną (50% do 70%) zdolnością do bioflokulacji.

Zdolność mikroorganizmów do komunikowania się ze sobą poprzez wykrywanie i reagowanie na cząsteczki sygnałowe, zwane autoinduktorami (quorum sensing), jest bardzo ważna podczas wyboru pożądanych bakterii do bioaugmentacji osadu czynnego, ponieważ może ona wspierać ich komunikację z mikroorganizmami autochtonicznymi w tym środowisku, a tym samym umożliwiać jego skuteczne zasiedlanie. Zjawisko to badali Wang i in. [2013], którzy wykazali, że laktony N-acylo-L-homoseryny (N-AHLs) wytwarzane przez *Acinetobacter* sp. TW były odpowiedzialne za ochronę komórek przed toksycznym wpływem ścieków przemysłowych i umożliwiły wbudowanie się tej bakterii w strukturę kłaczków osadu czynnego. Analiza zdolności bakterii Gram-ujemnych do wytwarzania N-AHLs w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej nie potwierdziła występowania tej cechy jedynie u szczepu *P. putida* N6.

Kolejny etap selekcji szczepów bakterii do bioaugmentacji osadu czynnego obejmował ocenę ich zdolności do wytwarzania substancji egzopolisacharydowych (EPS), które pośredniczą w agregacji komórek podczas tworzenia się kłaczków osadu czynnego, co determinuje ich budowę, ładunek i zdolności sedymentacyjne [Gnida i in., 2006]. Ponadto regiony hydrofobowe i liczne anionowe grupy funkcyjne obecne w strukturze EPS nie tylko pośredniczą w gromadzeniu składników odżywczych, ale także wiążą zanieczyszczenia obecne w ściekach, m.in. metale ciężkie [More i in., 2014; Gupta i Thakur, 2016]. Wyniki badań wykazały, że zdolność szczepów *P. putida* OR45a, *P. putida* KB3, *P. putida* mt-2, *P. fluorescens* i *S. maltophilia* KB2 do wytwarzania EPS może intensyfikować ich wzrost w obecności odcieków ze stawu Kalina w ściekach oraz tworzenie większych kłaczków o bardziej spoistej i regularnej strukturze. Proces powstawania kłaczków osadu czynnego jest także ściśle związany z hydrofobowością powierzchni komórek mikroorganizmów (CSH). Badania wykazały, że inokulacja osadu czynnego mikroorganizmami o wysokiej wartości CSH może przyspieszyć proces jego granulacji i usuwanie zanieczyszczeń w ściekach, m.in. związków aromatycznych, metali, azotu i fosforu, a także wspomóc adhezję i wzajemną agregację komórek [Adav i in., 2008; Liu i in., 2009]. Na podstawie uzyskanych wyników szczepy *P. putida* OR45a, *P. putida* KB3, *P. putida* mt-2 i *S. maltophilia* KB2 uznano jako te o najsilniejszych właściwościach hydrofobowych (CSH > 50%). Dla porównania hydrofobowość komórek pozostałych testowanych mikroorganizmów spadała w obecności 3,5% odcieków, co skutkowało zmianą profilu ich błony na bardziej hydrofilowy. Zjawisko to może być wynikiem zmniejszenia dostępności i przepuszczalności bakteryjnej ściany komórkowej dla zanieczyszczeń obecnych w wodach odciekowych, aby zapobiec przedostawaniu się zanieczyszczeń do wnętrza komórki [Fernandes i in., 2003]. Niemniej jednak, u dwóch szczepów - *P. putida* OR45a i *Planococcus* sp. S5 obecność odcieków prowadziła do modyfikacji powierzchni komórek w kierunku bardziej hydrofobowego charakteru, co może sugerować, że bakterie te były zdolne do degradacji zanieczyszczeń obecnych w wodach odciekowych. Podobne wnioski wysunęli Wick i in. [2003] przypisując wzrost hydrofobowości komórek szczepu *Mycobacterium frederiksbergense* w obecności antracenu w podłożu wzrostu, jego zdolności do wykorzystania tego związku jako źródła węgla i energii.

Metabolizm wielu zanieczyszczeń obecnych w środowisku jest często utrudniony ze względu na ich hydrofobowy charakter. Zdolność do produkcji związków zwanych biosurfaktantami, które zmniejszają napięcie powierzchniowe i międzyfazowe, a tym samym zwiększają dostępność zanieczyszczeń dla mikroorganizmów jest pożądaną cechą kandydatów do bioaugmentacji środowisk

zanieczyszczonych odciekami ze składowisk odpadów [Fernandes i in., 2003; Liu i in., 2009]. Dane literaturowe wskazują na poprawę wydajności biodegradacji, m.in. nonylofenolu i zanieczyszczeń pochodzących z przemysłu papierniczego w osadzie czynnym bioaugmentowanym odpowiednio szczepem *Sphingomonas* sp. TTNP3 i *Gordonia* JW8 [Cirja i in., 2009; Chen i in., 2012]. Wstępna ocena zdolności szczepów testowanych pod kątem bioaugmentacji osadu czynnego obciążonego odciekami ze stawu Kalina do produkcji biosurfaktantów wskazała szczepy *P. putida* OR45a, *P. putida* KB3, *P. putida* mt-2, *P. fluorescens* i *S. maltophilia* KB2 jako potencjalnie zdolne do produkcji związków powierzchniowo czynnych. Analiza potencjalnych producentów biosurfaktantów pod kątem ich zdolności do emulgowania węglowodorów obecnych w oleju diesla wykazała jednak, że jedynie szczepy *P. putida* OR45a i *P. putida* KB3 produkowały związki odznaczające się wysoką aktywnością emulgującą (> 45%).

Jednym z mechanizmów chroniących bakterie przed toksycznym działaniem zanieczyszczeń w ściekach jest ich zdolność do chemotaksji. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji stwierdzono, że obecność odcieków w podłożu wzrostu prowadziła do zmniejszenia się ruchliwości szczepów: *R. erythropolis* KB4, *Planococcus* sp. S5, *P. putida* N6, *P. putida* OR45a, *P. putida* KB3, *S. maltophilia* KB2, *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp. i *G. soli* OR45b. Spośród badanych bakterii jedynie szczep *P. putida* mt-2 wykazywał chemotaksję dodatnią w kierunku obecnych w podłożu wzrostu odcieków.

Przeprowadzone analizy fenotypowe i biochemiczne umożliwiły wstępnie wyłonienie dwóch potencjalnych kandydatów *P. putida* OR45a i *P. putida* KB3 do bioaugmentacji osadu czynnego obciążonego odciekami ze stawu Kalina. Wybrane mikroorganizmy charakteryzowały się wysokim potencjałem metabolicznym oraz posiadały cechy wspomagające degradację zanieczyszczeń i wbudowywanie się w strukturę osadu czynnego. Analiza genomowa *in silico* potwierdziła obecność w genomach obu bakterii genów kodujących enzymy zaangażowane w szlaki rozkładu związków aromatycznych, m.in. oksydaz odpowiedzialnych za hydroksylację i rozszczepienie pierścienia aromatycznego (gen *hcA2*). W genomach obu szczepów stwierdzono także obecność genów 1,2-dioksygenazy katecholowej, jak również 2,3-dioksygenazy katecholowej (*catA* i *dmpB*). Analizy genomowe potwierdziły wyniki uzyskane z wykorzystaniem systemu BIOLOG[®], wskazując na zdolność badanych szczepów do efektywnej biodegradacji fenolu i benzoenu. Ponadto w genomach obu szczepów wykazano obecność genu *oscA*, który koduje zależną od żelaza dysmutazę ponadtlenkową, co może wspomagać przetrwanie tych bakterii w niesprzyjających warunkach. Wyniki te sugerują, że bioaugmentacja osadu czynnego z użyciem szczepów *P. putida* OR45a i *P. putida* KB3 może być pomocniczą strategią w zmniejszaniu stresu oksydacyjnego w bioreaktorach narażonych na różne toksyczne związki obecne w ściekach. Przeprowadzone analizy genomowe wskazały także na zdolność szczepów: *P. putida* OR45a i *P. putida* KB3 do syntezy alginianu. Uważa się, że ten egzopolisacharyd pełni funkcję ochronną w środowisku, w którym mikroorganizmy są stale narażone na stres oksydacyjny [Hentzer i in., 2001]. Ponadto Lin i in. [2008] wykazali, że produkowany przez bakterie alginian pozytywnie wpływał na proces tworzenia kłaczków osadu czynnego i jego właściwości sedimentacyjne. Z kolei na funkcję ochronną tego egzopolisacharydu przed drapieżnictwem ze strony pierwotniaków zwrócili uwagę Matz i in. [2004].

Wynikiem współczyszczenia ścieków z odciekami ze składowisk odpadów jest narażenie mikroorganizmów autochtonicznych osadu czynnego nie tylko na działanie związków fenolowych, ale również rozpuszczalników organicznych, antybiotyków, metali ciężkich oraz jonów amonowych. Podstawowe mechanizmy tolerancji bakterii na obecność rozpuszczalników obejmują działanie systemów pomp błonowych (*ang. efflux pumps*), które usuwają toksyczne substancje z komórki [Rojas i in., 2001]. U obu kandydatów do bioaugmentacji osadu czynnego potwierdzono obecność pomp zwiększających oporność tych szczepów na różne rozpuszczalniki, takie jak: *n*-heksan, *p*-ksylen, toluen, styren, *m*-ksylen, propylobenzen i etylobenzen. Ponadto wykazano, że szczep *P. putida* KB3 jest odporny na antybiotyki, m.in. ampicylinę, penicylinę G, erytromycynę, nowobiocynę i tetracyklinę. W genomach obu szczepów stwierdzono obecność operonu *mer*, związanego z opornością komórek na jony Hg²⁺. Ponadto w genomie szczepu *P. putida* KB3 potwierdzono obecność genów kodujących białka odpowiedzialne za przeciwdziałanie stresowi oksydacyjnemu wywołanemu przez jony chromu. Dane

literaturowe dowodzą, że wzrost stężenia tego pierwiastka w ściekach powyżej 10 µg/ml może prowadzić do inhibicji oddychania i zahamowania wzrostu drobnoustrojów w osadzie czynnym [Stasinakis i in., 2002]. Z przeprowadzonych badań wynika, że obecność jonów chromu (Cr^{6+}) w środowisku wzrostu w stężeniach odpowiednio, 8,30 i 11,30 µg/µl nie powodowała zahamowania wzrostu szczepów *P. putida* OR45a i *P. putida* KB3. Wykorzystanie tradycyjnej technologii osadu czynnego do współocyszczania ścieków z odciekami ze składowisk odpadów jest bardzo trudne, szczególnie w przypadku wód odciekowych pochodzących z ustabilizowanych i starych składowisk, które charakteryzują się wysokim poziomem azotu amonowego (360 do 2150 µg/ml) [Kumar i Allapat 2005 a czy b]. Udowodniono, że wysokie stężenie azotu amonowego w ściekach może przyczyniać się do zahamowania wzrostu i aktywności mikroorganizmów w osadzie czynnym i w związku z tym prowadzić do zaburzenia procesu biodegradacji zanieczyszczeń [Li i Zhao, 1999]. Ze względu na te problemy konieczne jest zatem usunięcie tego zanieczyszczenia ze ścieków. Nieliczne badania wskazują jednak na osiągnięcie efektywnego procesu współocyszczania ścieków i odcieków charakteryzujących się wysokim stężeniem azotu amonowego [Yu i in., 2014]. Wyniki badań prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy wskazują, że szczepy *P. putida* OR45a i *P. putida* KB3 mogą być wykorzystane do bioremediacji środowisk zanieczyszczonych N-NH_4^+ , ze względu na ich zdolność do wzrostu w obecności wysokich stężeń jonów amonowych, wynoszących odpowiednio 600 i 1000 µg/ml. Wyniki tej części badań opublikowano w pracy Michalskiej i in. [2020a], która stanowi rozdział II.4 prezentowanej rozprawy.

I.4.3 Ocena efektywności bioaugmentacji osadu czynnego szczepami *P. putida* OR45a i *P. putida* KB3 oraz ich konsorcjum w oczyszczaniu ścieków obciążonych odciekami ze stawu Kalina

Ostatnim etapem prac było zbadanie efektywności oczyszczania ścieków w bioaugmentowanym osadzie czynnym, obciążonym odciekami ze stawu Kalina, z użyciem wyselekcjonowanych szczepów *P. putida* OR45a i *P. putida* KB3 oraz ich konsorcjum. Wykorzystane w eksperymencie bioaugmentacyjnym odcieki zostały dodatkowo skażone mieszaniną siedmiu związków fenolowych: fenolu, 3-metylofenolu, 4-metylofenolu, 3-etylofenolu, 2,4-dimetylofenolu, 3,4-dimetylofenolu i 2,3,5-trimetylofenolu, aby odzwierciedlić rzeczywiste stężenie fenoli w odciekach ze stawu Kalina, odnotowane w okresie rewitalizacji zbiornika. Po zakończeniu eksperymentu istotne statystyczne ($p < 0,05$) ubytki badanych związków fenolowych stwierdzono we wszystkich bioaugmentowanych reaktorach. Największy ubytek fenoli (95%) odnotowano w osadzie czynnym bioaugmentowanym szczepem *P. putida* KB3, podczas gdy w osadzie niepoddanym bioaugmentacji, w którym mikroorganizmy autochtoniczne nie były zdolne do całkowitego rozkładu związków fenolowych obecnych w odcieku, szczególnie 4-metylofenolu, 3,4-dimetylofenolu i 2,3,5-trimetylofenolu, był on prawie 2-krotnie niższy (50%). Wysoka efektywność usuwania związków fenolowych w układach inokulowanych szczepami *P. putida* OR45a i *P. putida* KB3 oraz ich konsorcjum była jednocześnie skorelowana z wysoką skutecznością usuwania zanieczyszczeń organicznych wyrażonych jako ChZT (odpowiednio 79%, 86% i 83%) oraz azotu amonowego (odpowiednio 88%, 91%, i 88%), które w osadzie niebioaugmentowanym wynosiły odpowiednio 45% i 64%. Wyniki badań bioaugmentacyjnych potwierdziły dodatkowo, że oba szczepy wykazywały zdolność do intensywnego usuwania azotu amonowego w ściekach. Introdukowanie szczepów bakteryjnych do bioreaktorów korespondowało jednocześnie z powstawaniem wysokiej jakości ścieków oczyszczonych o lekko alkalicznym pH (7,45-8,19) i WWQI mieszczącym się w zakresie od 57 do 88. Z drugiej strony zaburzenia procesu usuwania zanieczyszczeń w bioreaktorze niebioaugmentowanym i wystawionym na działanie odcieków prowadziły do powstania ścieków o złej jakości, o czym świadczyło ich silnie alkaliczne pH (9,47) i WWQI = 250. Odczyn ścieków jest jednym z najbardziej krytycznych czynników świadczących o stabilnej pracy oczyszczalni ścieków, ponieważ wpływa na wytrzymałość i ładunek powierzchniowy kłaczek osadu czynnego [Hong i in., 2016]. Bioaugmentacja

osadu z użyciem wyizolowanych szczepów umożliwiła utrzymanie stabilności procesu oczyszczania ścieków. Powyższa obserwacja może wskazywać na to, że między inokulowanymi do bioreaktora szczepami bakteryjnymi, jak również między tymi szczepami a mikroorganizmami autochtonicznymi nie doszło do oddziaływań antagonistycznych. Udaną bioaugmentację odcieków pochodzących ze stawu na wysypisku odpadów Bukit Beruntung (Malezja) szczepem *Bacillus salmalaya* 139SI przeprowadzili Dadrasnia i in. [2017], którzy zaobserwowali, że wprowadzenie tej bakterii do wód odciekowych korespondowało ze wzrostem efektywności usuwania ChZT i N-NH₄⁺ z około 30% do odpowiednio 91% i 80%, w porównaniu do odcieku niebioaugmentowanego. Z kolei Yu i in. [2014] wykazali, że skuteczność usuwania ChZT i N-NH₄⁺ w ściekach obciążonych odciekami ze starego składowiska odpadów zlokalizowanego w pobliżu miasta Chang Chun (Chiny) osiągnęła 86% i 50% oraz 90% i 50% w układach inokulowanych odpowiednio *Bacillus cereus* Jlu i *Enterococcus casseliflavus* Jlu. Dla porównania bakterie autochtoniczne obecne w tym środowisku były zdolne do usunięcia 70% ChZT i 40% N-NH₄⁺.

Pomiar właściwej szybkości pobierania tlenu (SOUR) jest istotnym wskaźnikiem stosowanym do oceny kondycji osadu czynnego w bioreaktorze i identyfikacji potencjalnych niestabilności systemu oczyszczania ścieków, ponieważ opisuje szybkość oddychania mikroorganizmów, silnie związaną z ich aktywnością metaboliczną oraz żywotnością [Zubrowska-Sudol i Walczak, 2014]. W kolejnym etapie badań bioaugmentacyjnych przeprowadzono zatem ocenę wpływu bioaugmentacji na kondycję, aktywność enzymatyczną i metaboliczną oraz potencjał funkcjonalny osadu czynnego, obciążonego odciekami ze stawu Kalina. Stwierdzono, że obecność odcieku w ściekach przyczyniła się do obniżenia wartości SOUR w osadzie czynnym o 53% (z 8,4 do 3,9 mgO₂/g MLSS · h). Dla porównania parametr ten osiągał prawie 2-3-krotnie wyższe wartości w bioreaktorach obciążonych odciekami i bioaugmentowanych szczepami bakterii (7,9 - 8,4 mgO₂/g MLSS · h), a także w reaktorze kontrolnym, oczyszczającym jedynie ścieki syntetyczne (9,1 mgO₂/g MLSS · h). Podobne zjawisko zaobserwowali Eichner i in. [1999], którzy stwierdzili, że spadek poboru tlenu przez mikroorganizmy obecne w bioreaktorze był wynikiem stresu spowodowanego obciążeniem osadu czynnego wysokim ładunkiem zanieczyszczeń. Natomiast w badaniach przeprowadzonych przez Contreras i in. [2008] pomiar SOUR, wykorzystany do oceny toksyczności fenolu względem nieaklimatyzowanych i aklimatyzowanych autochtonicznych mikroorganizmów w osadzie czynnym, wykazał, że fenol był toksyczny jedynie dla mikroorganizmów, które wcześniej nie były przystosowane do jego obecności w ściekach. Pojawienie się tego związku w osadzie czynnym, niemającym wcześniej kontaktu z fenolem, przyczyniło się do obniżenia poziomu respiracji mikroorganizmów autochtonicznych w tym środowisku o 75%.

Aktywność enzymatyczna mikroorganizmów autochtonicznych w osadzie czynnym jest niezwykle ważna dla właściwego funkcjonowania i utrzymania stabilności tego ekosystemu. Warto podkreślić, że parametr ten z reguły nie jest brany pod uwagę podczas oceny wpływu odcieków na stan osadu. Ponieważ dehydrogenazy, nieswoiste esterazy i katalazy odgrywają kluczową rolę w procesie metabolizowania zanieczyszczeń w ściekach, w przeprowadzonych badaniach bioaugmentacyjnych oceniono wpływ odcieków na ich aktywność. Stwierdzono, że obecność odcieków w ściekach w największym stopniu wpłynęła na aktywność enzymów w bioreaktorze niepoddanym bioaugmentacji, przyczyniając się do znacznego zmniejszenia aktywności dehydrogenaz, nieswoistych esteraz i katalaz, odpowiednio o 76%, 59% i 18%. Dla porównania aktywność tych enzymów w reaktorze kontrolnym oraz w bioreaktorach bioaugmentowanych była 3-4-krotnie wyższa. Spośród badanych enzymów dehydrogenazy okazały się najbardziej wrażliwe na toksyczne składniki odcieków. Podobne zjawisko opisali Yao i in. [2013], którzy stwierdzili, że spośród wielu enzymów, których aktywność badano w osadzie czynnym zanieczyszczonym tetrahydrofuranem, aktywność dehydrogenaz była zbliżona do granic poziomu wykrywalności i prawie całkowicie została zahamowana. Powyższa obserwacja wiązała się także ze znaczącym spadkiem różnorodności strukturalnej zespołów drobnoustrojów w tym ekosystemie. Innymi ważnymi enzymami o kluczowym znaczeniu w procesie rozkładu zanieczyszczeń są esterazy. Ze względu na szeroką specyficzność substratową, enzymy te biorą udział w rozkładzie

wielu związków naturalnych oraz ksenobiotyków [Boczar i in., 2001] i dzięki tej właściwości mogą służyć do oceny aktywności oraz żywotności mikroorganizmów. Ponadto esterazy są wrażliwe na zmiany parametrów operacyjnych procesu oczyszczania ścieków, m.in. pH i temperatury, i podobnie jak katalazy uczestniczą także w obronie komórek mikroorganizmów przed stresem oksydacyjnym [Amariei i in., 2020]. Obserwowany w 32 dniu eksperymentu nieznaczny wzrost aktywności esteraz w osadzie czynnym obciążonym odciekami w stężeniu 3,5% może być związany z próbą adaptacji mikroorganizmów autochtonicznych do zanieczyszczeń pochodzących z wód odciekowych. Jednakże gwałtowny spadek aktywności tych enzymów wraz ze wzrostem udziału procentowego odcieków w ściekach z 3,5% do 5,5%, a następnie do 12,5% świadczy o toksycznym wpływie zanieczyszczeń obecnych w wodach odciekowych na populację mikroorganizmów. Ponieważ odczyn ścieków ma duże znaczenie dla aktywności esteraz, spadek ich aktywności w bioreaktorze niebioaugmentowanym i obciążonym odciekami może być związany ze znacznym wzrostem pH w ściekach powyżej 8,5, co mogło spowodować dezaktywację tych enzymów [Martínez-Martínez i in., 2014]. Ponieważ wprowadzenie szczepów *P. putida* KB3 i *P. putida* OR45a oraz ich konsorcjum do osadu czynnego pozwoliło na zniesienie efektu toksycznego wywoływanego przez odcieki, można sądzić, że materiał genetyczny tych bakterii niósł geny kodujące białka odpowiedzialne za przeciwdziałanie stresowi oksydacyjnemu.

Sukces bioaugmentacji osadu czynnego zależy w dużej mierze od zdolności introdukowanych bakterii do przeżycia i utrzymania wysokiej aktywności w tym środowisku. Wyniki przeprowadzonych badań dowiodły, że aktywność enzymatyczna w bioaugmentowanym bioreaktorze była wyższa podczas współoczyszczania ścieków z odciekami niż w bioreaktorze niepoddanym bioaugmentacji. Wzrost aktywności drobnoustrojów w bioaugmentowanym osadzie czynnym obciążonym odciekami był skorelowany ze wzrostem biomasy osadu, a także liczebności mikroorganizmów heterotroficznych, podczas gdy w bioreaktorze niepoddanym bioaugmentacji nastąpiło znaczne obniżenie wartości tych parametrów. Można sugerować, że obecne w odciekach związki chemiczne nie były metabolizowane przez mikroorganizmy autochtoniczne, ale mogły być wykorzystywane przez introdukowane do osadu szczepy bakteryjne. Na takie zjawisko może wskazywać wzrost liczebności bakterii heterotroficznych zdolnych do rozkładu fenolu jako jedynego źródła węgla i energii w bioaugmentowanym osadzie czynnym. Dodatnią korelację pomiędzy wzrostem biomasy osadu a wydajnością degradacji zanieczyszczeń w bioaugmentowanym bioreaktorze wykazali także Yao i in. [2013], którzy potwierdzili całkowite usunięcie tetrahydrofuranu w ściekach przy wzroście biomasy osadu czynnego z 2,1 g/l do 7,3 g/l.

Wysoka wydajność metaboliczna mikroorganizmów osadu czynnego uważana jest za niezwykle ważny parametr w skutecznym oczyszczaniu ścieków w oczyszczalniach [Xia i in., 2018]. Stwierdzono, że mikroorganizmy w reaktorach SBR zasilanych mieszaniną ścieków i odcieków ze stawu Kalina były mniej metabolicznie aktywne ($A_{max} = 0,37$) niż bakterie w bioreaktorze kontrolnym ($A_{max} = 1,20$) oraz w bioaugmentowanych reaktorach obciążonych odciekami ($A_{max} = 0,90 - 1,03$). Dane literaturowe wskazują, że introdukowanie bakterii egzogennych do osadu czynnego może prowadzić do zmian strukturalnych zespołów mikroorganizmów w tym środowisku. Fang i in. [2013] na przykład stwierdzili, że szczepy bakterii inokulowane do bioreaktora mogą być zdolne do stałego wzrostu w tym środowisku, przejmując kluczową rolę w usuwaniu zanieczyszczeń w ściekach. Jak wykazano wprowadzenie do bioreaktorów obciążonych odciekami szczepów z rodzaju *Pseudomonas* pozwoliło na utrzymanie wysokiej aktywności metabolicznej i różnorodności funkcjonalnej ($H'_{ECO} < 2,64 - 2,94 >$) w tych systemach, w przeciwieństwie do nieinokulowanego osadu obciążonego wodami odciekowymi, dla którego wartość H'_{ECO} wynosiła 1,66. Analiza profili metabolicznych zespołów mikroorganizmów obecnych w osadzie czynnym oczyszczającym mieszaninę ścieków syntetycznych i odcieków wskazała na mniejszą specjalizację bakterii w reaktorach inokulowanych wyselekcjonowanymi szczepami bakteryjnymi. Obecność odcieków w mniejszym stopniu wpłynęła na efektywność wykorzystania węglowodanów, aminokwasów, środków powierzchniowo czynnych i polimerów przez

mikroorganizmy w bioaugmentowanym osadzie czynnym niż w środowisku, do którego nie wprowadzono wyselekcjonowanych szczepów bakteryjnych. Znaczny wzrost zdolności zespołów mikroorganizmów autochtonicznych w osadzie czynnym bioaugmentowanym z użyciem wyizolowanych szczepów z rodzaju *Pseudomonas* do metabolizowania związków fenolowych może wskazywać na zdolność inokulowanych bakterii do przetrwania i proliferacji w tym środowisku.

Po raz pierwszy w tej pracy do oceny wpływu odcieków na mikroorganizmy osadu czynnego oraz efektywność bioaugmentacji wykorzystano indeks aktywnej biomasy (*ang. ABI – active biomass index*) oraz indeks biomasy narażonej na stres (*ang. SBI – stress biomass index*), oznaczone na podstawie pomiarów stężenia całkowitego, zawieszonego i wewnątrzkomórkowego ATP. Archibald i in. [2001] udokumentowali, że pomiar ATP może stanowić użyteczne narzędzie do monitorowania żywotności komórek w osadzie czynnym, będąc jednocześnie wskaźnikiem oceny toksyczności związków obecnych w ściekach. Ponadto badania przeprowadzone przez Pistelok i in. [2016] wykazały, że analizy ATP mogą być przydatne do szybkiej oceny efektywności oczyszczania ścieków i z powodzeniem mogą uzupełnić informacje uzyskane z pomiarów innych wskaźników, między innymi: węgla organicznego, zawartości zawiesin, BZT i ChZT. Obecność odcieku w ściekach stanowiła silny czynnik stresowy dla mikroorganizmów w osadzie czynnym. Stwierdzono, że bioreaktor obciążony odciekami nie działał prawidłowo, o czym świadczył wysoki wskaźnik SBI (> 50%). Natomiast wprowadzenie wyselekcjonowanych szczepów bakteryjnych do osadu czynnego łagodziło toksyczne działanie obecnych w odciekach substancji, a tym samym przyczyniało się do obniżenia poziomu stresu w tym środowisku (SBI < 40%).

Analiza parametrów operacyjnych, wskaźników kondycji osadu czynnego i potencjału funkcjonalnego mikroorganizmów autochtonicznych w osadzie czynnym obciążonym odciekami ze stawu Kalina wskazała na silną korelację między bioaugmentacją a wysoką efektywnością procesu oczyszczania ścieków i aktywnością mikrobiologiczną. Potwierdzony badaniami jest fakt, że inokulacja osadu czynnego szczepem *P. putida* KB3 była nieznacznie bardziej skuteczna niż bioaugmentacja z użyciem szczepu *P. putida* OR45a oraz konsorcjum złożonego ze szczepów OR45a i KB3 i prowadziła do osiągnięcia wysokiej aktywności enzymatycznej w tym ekosystemie oraz tworzenia dobrej jakości ścieków. Niemniej jednak inokulacja osadu czynnego szczepem *P. putida* OR45a korespondowała z zachowaniem w tym ekosystemie wysokiej aktywności mikroorganizmów autochtonicznych zdolnych do wykorzystywania źródeł fosforu. Wzrost efektywności usuwania wielu zanieczyszczeń w osadzie czynnym bioaugmentowanym konsorcjami mikroorganizmów o różnym składzie udokumentowany został przez wielu autorów [Ma i in., 2009; Kim i in., 2013; Vural i in., 2020]. Przegląd literatury wskazuje jednak na przypadki, w których bioaugmentacja z użyciem pojedynczych szczepów bakterii była bardziej skuteczna niż zastosowanie do tego celu konsorcjów bakterii [Festa i in., 2016]. Uzyskanie podobnych efektów w wyniku bioaugmentacji osadu czynnego z użyciem pojedynczych szczepów *P. putida* OR45a i *P. putida* KB3 oraz konsorcjum złożonego z tych bakterii (1:1, v/v) może wynikać z faktu, że liczebność każdego ze szczepów wprowadzonych do osadu pojedynczo ($1 \cdot 10^6$ jtk/g MLSS) była 2-krotnie wyższa niż bakterii wprowadzonych do bioreaktora w postaci konsorcjum ($0,5 \cdot 10^6$ jtk/g MLSS). Wyniki tej części badań opublikowano w pracy **Michalskiej i in. [2020b]**, która stanowi rozdział **II.5** niniejszej rozprawy.

I.5. Literatura

1. Adav S.S., Lee D.J., Lai J.Y. 2008. Intergeneric coaggregation of strains isolated from phenol-degrading aerobic granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 79: 657–661
2. Ahmed M.B., Zhou J.L., Ngo H.H., Guo W., Thomaidis N.S., Xu J. 2017. Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater: a critical review. *J. Hazard. Mater.*, 323: 274-298
3. Amariei G., Boltes K., Rosal R., Leton P. 2020. Enzyme response of activated sludge to a mixture of emerging contaminants in continuous exposure. *PLOS ONE*, 15(1): e0227267
4. APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation: Washington, DC, USA, 1999
5. Archibald M., Méthot M., Young F., Paice M.G. 2001. A simple system to rapidly monitor activated sludge health and performance. *Water Res.*, 35: 2543–2553
6. Artan N., Orhon D. Mechanism and design of sequencing batch reactors for nutrient removal. IWA Publishing, London, UK, 2005
7. Atkas F., Çeçen Ö. 2004. Aerobic co-treatment of landfill leachate with domestic wastewater. *Environ. Eng. Sci.*, 21: 303-312
8. Aziz S.Q., Aziz H.A., Yusoff M.S., Mohaheri S. 2012. Removal of phenol and other pollutants from different landfill leachates using powdered activated carbon SBR supplemented technology. *Environ. Monit. Assess.*, 184: 6147–6158
9. bdl.stat.gov.pl
10. Bergeron J., Paice M.G. 2001. Monitoring of activated sludge systems using a combination of specific oxygen uptake rates and specific adenosine triphosphate measurements. *Water Qual. Res. J. Canada*, 36: 659–685
11. Bochenek D., Dzik M., Górka A., Kiełczykowska A., Kulasza A., Nowakowska B., Pawłowska T., Rudnicka M., Sulik J., Szondelmejer K., Wojciechowska M., Wrzosek A., Wrzosek P. Ochrona środowiska 2018. Główny Urząd Statystyczny, Departament Badań Przestrzennych i Środowiska, Warszawa, 2018
12. Boczar B.A., Forney L.J., Begley W.M., Larson R.J., Federle T.W. 2001. Characterization and distribution of esterase activity in activated sludge. *Water Res.*, 35: 4208–4216
13. Bolyard S.C., Reinhart D.R., Loziński D., Motlagh A.M. Leachate dissolved organic matter impacts on wastewater effluent quality. In: Proceedings of the global waste management symposium, Palm Springs, CA, USA, 11–14, 2018
14. Brennan R.B., Healy, M.G., Morrison L., Hynes S., Norton D., Clifford E. Suitability of municipal wastewater treatment plants for the treatment of landfill leachate, EPA Research Report (2013-W-FS-13). Environmental Protection Agency: Wexford, Ireland, 2017
15. Campos R., Ferraz F.M., Vieira E.M., Povinelli, J. 2014. Aerobic co-treatment of landfill leachate and domestic wastewater – are slowly biodegradable organics removed or simply diluted? *Water Sci. Technol.*, 70: 1941–1947
16. Çeçen F., Tezel U. Hazardous pollutants in biological treatment systems: fundamentals and a guide to experimental research. IWA Publishing: London, UK, 2018
17. Chen J., Zhan P., Koopman B., Fang G., Shi Y. 2012. Bioaugmentation with *Gordonia* strain JW8 in treatment of pulp and paper wastewater. *Clean Technol. Envir.*, 14: 899–904
18. Cheng Z., Meng X., Wang H., Chen M., Li M. 2014. Isolation and characterization of broad spectrum coaggregating bacteria from different water systems for potential use in bioaugmentation. *PLoS ONE*, 9(4): e94220

19. Chojniak J., Wasilkowski D., Płaza G., Mrozik A., Brigmon R. 2015. Application of Biolog microarrays techniques for characterization of functional diversity of microbial community in phenolic-contaminated water. *Int. J. Environ. Res.*, 9: 785–794
20. Chong N.M, Pai S.L., Chen C.H. 1997. Bioaugmentation of an activated sludge receiving pH shock loadings. *Bioresour. Technol.*, 59: 235–240
21. Christensen T.H., Kjeldsen P., Bjerg P.L., Jensen D.L., Christensen J.B., Baun A., Albrechtsen H.J., Heron G. 2001. Biogeochemistry of landfill leachate plumes. *Appl. Geochem.*, 16: 659–718
22. Chudoba E.A., Mallin M.A., Cahoon, L.B., Skrabal S.A. 2013. Stimulation of fecal bacteria in ambient waters by experimental inputs of organic and inorganic phosphorus. *Water Res.*, 47: 3455–3466
23. Cirja M., Hommes G., Ivashechkin P., Prell J., Schäffer A., Corvini F. X., Lenz M. 2009. Impact of bioaugmentation with *Sphingomonas* sp. strain TTNP3 in membrane bioreactors degrading nonylphenol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84: 193–189
24. Contreras E.M., Albertario M.E., Bertola N.C., Zaritzky, N.E. 2008. Modelling phenol biodegradation by activated sludges evaluated through respirometric techniques. *J. Hazard. Mater.*, 158: 366–374
25. Cossu R., Stegmann R. *Solid waste landfilling: concept, processes, technologies.* Elsevier Science Publishers Ltd., England, 2018
26. Cozma P., Hilhor R.M., Apostol L.C., Diaconu M., Pogăcean M.O., Gavrilescu M. 2012. Aerobic biodegradation of phenol by activated sludge in a batch reactor. *Environ. Eng. Manag. J.*, 11: 2053–2058
27. Dadrasnia A., Azirun M.S., Ismail S.B. 2017. Optimal reduction of chemical oxygen demand and NH₃-N from landfill leachate using a strongly resistant novel *Bacillus salmalaya* strain. *BCM Biotechnol.*, 17: 1–24
28. De Albuquerque E.M., Pozzi E., Sakamoto I.K., Jurandyr P. 2018. Treatability of landfill leachate combined with sanitary sewage in an activated sludge system. *J. Water Process Eng.*, 23: 119–128
29. de Freitas Bueno R., Piveli R.P., Campos F. 2019. Extended aeration activated sludge process operated under low dissolved oxygen concentration: kinetic behavior of nitrifying heterotrophic and autotrophic bacteria. *Eng. Sanit. Ambient.*, 24: 939-947
30. Déziel E., Comeau Y., Villemur R. 2001. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J. Bacteriol.*, 183: 1195–1204
31. Di Gioia D., Fambrini L., Coppini E., Fava F., Barberio C. 2004. Aggregation-based cooperation during bacterial aerobic degradation of polyethoxylated nonylphenols. *Res. Microbiol.*, 155: 761–769
32. Drewnowski J. 2014. The impact of slowly biodegradable organic compounds on the oxygen uptake rate in activated sludge systems. *Water Sci. Technol.*, 69: 1136–1144
33. Duan Z. 2011. Microbial degradation of phenol by activated sludge in a batch reactor. *Environ. Prot. Eng.*, 37: 53–63
34. Dueholm M.S., Marques. I.G., Karst S.M., D'Imperio S., Tale V.P., Lewis D., Nielsen P.H., Nielsen J.L. 2015. Survival and activity of individual bioaugmentation strains. *Bioresour. Technol.*, 186: 192–199
35. Dyrektywa 1999/31/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 26 kwietnia 1999 r. w sprawie składowania odpadów (Dz. Urz. UE L z 1999 r. Nr 182, s. 1)
36. Dyrektywa 2008/98/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 19 listopada 2008 r. w sprawie odpadów oraz uchylająca niektóre dyrektywy (Dz. Urz. UE L z 2008 r. Nr 312, s. 3)
37. Eichner C.A., Erb R.W., Timmis K.N., Wagner-Döbler I. 1999. Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 102–109

38. El-Fadel M., Sleem F., Hashisho J., Saikaly P.E., Alameddine I., Ghanimeh S. 2018. Impact of SRT on the performance of MBRs for the treatment of high strength landfill leachate. *Waste Manag.*, 73: 165–180
39. El-Gohary F., Hassan G.K. 2016. Characterization and biological treatment of pre-treated landfill leachate. *Ecol. Eng.*, 94: 268-274
40. EN ISO 9308-1:2014-12/A1:2017-04. Water quality—enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria—membrane filtration method for waters with low bacterial background flora. Polish Committee for Standardization: Warsaw, Poland, 2017
41. EN ISO 5667-13:2011. Water Quality—sampling—guidance on sampling of sludges. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2011
42. EN ISO 8199:2010. Water quality—general requirements and guidance for microbiological examinations by culture. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2010
43. EN ISO 19458:2007P. Water quality—sampling for microbiological analysis. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2007
44. Fang F., Han H., Zhao Q., Xu C., Zhang L. 2013. Bioaugmentation of biological contact oxidation reactor (BCOR) with phenol-degrading bacteria for coal gasification wastewater (CGW) treatment. *Bioresour. Technol.*, 150: 314–320
45. Faudala-Książek S., Luczkiewicz A., Fitbor K., Olanczuk-Neyman K. 2014. Nitrogen removal via the nitrite pathway during wastewater co-treatment with ammonia-rich landfill leachates in a sequencing batch reactor. *Environ Sci. Pollut. Res.*, 21: 7307-7318
46. Fenu A., Donckels B.M.R., Beffa T., Bemfroh C., Weemaes M. 2015. Evaluating the application of *Microbacterium* sp. strain BR1 for the removal of sulfamethoxazole in full-scale membrane bioreactors. *Water Sci. Technol.*, 72: 1754–1761
47. Fernandes P., Ferreira B.S., Cabral J.M.S. 2003. Solvent tolerance in bacteria: role of efflux pumps and cross-resistance with antibiotics. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 22: 211–216
48. Festa S., Macchi M., Cortés F., Morelli I.S., Coppotelli, B.M. 2016. Monitoring the impact of bioaugmentation with a PAH-degrading strain on different soil microbiomes using pyrosequencing. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 92: 1-12
49. Foo K.Y., Hameed B.H. 2009. An overview of landfill leachate treatment via activated carbon adsorption process. *J. Hazard. Mater.*, 171: 54–60
50. Freeman D.J., Falkiner F.R., Keane C.T. 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J. Clin. Pathol.*, 42: 872–874
51. Gerardi M.H. Wastewater bioaugmentation and biostimulation. DEStech Publications, Lancaster 2016
52. Ghanizadeh G., Sarrafpour R. 2001. The effects of temperature and pH on the settleability of activated sludge flocs. *Iran. J. Publ. Health*, 30: 139–142
53. Giotis E.S., McDowell D.A., Blair I.S., Wilkinson B.J. 2007. Role of branched-chain fatty acids in pH stress tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 997–1001
54. Gnida A., Chorvatova M., Vanner J. 2006. The role and significance of extracellular polymers in activated sludge. Part I: literature review. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 34: 411 – 424
55. Gomaa E.Z., El-Meihy R.M. 2019. Bacterial biosurfactant from *Citrobacter freundii* MG812314.1 as a bioremoval tool of heavy metals from wastewater. *Bull. Natl. Res. Cent.*, 43: 69
56. Griebe T., Schaule G., Wuertz S. 1997. Determination of microbial respiratory and redox activity in activated sludge. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 19: 118–122
57. Grosser A., Neczaj E., Madela M., Celary P. 2018. Treatment of landfill leachate using ultrasound assisted SBR reactor. *Proceedings*, 2: 648

58. Guo J., Wang J., Cui D., Wang L., Ma F., Chang C.C., Yang J. 2010. Application of bioaugmentation in the rapid start-up and stable operation of biological processes for municipal wastewater treatment at low temperatures. *Bioresour. Technol.*, 110: 6622–6629
59. Gupta A., Thakur I.S. 2016. Study of optimization of wastewater contaminant removal along with extracellular polymeric substances (EPS) production by a thermotolerant *Bacillus* sp. ISTVK1 isolated from heat shocked sewage sludge. *Bioresour. Technol.*, 213: 21–30
60. Gupta V.G., Pandey A. New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: microbial secondary metabolites biochemistry and applications. *Microbial secondary metabolites. Biochemistry and applications.* Elsevier, Amsterdam, Holandia, 2019
61. Hagman M., Jansen J.L.C. 2007. Oxygen uptake rate measurements for application at wastewater treatment plants. *Vatten*, 63: 131–138
62. Hardo G., Karunakaran E., Couto N.A., Beckerman A.P. Pandhal J. 2019. Designing synthetic bacterial consortia for landfill leachate treatment based on community matrices and regression tree analysis. *Frontiers*, doi:10.1101/543694
63. Hentzer M., Teitzel G.M., Balzer G.J., Heydorn A., Molin S., Givskov M., Parsek M.R. 2001. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J. Bacteriol.*, 183: 5395–5401
64. Herrero M., Stuckey D.C. 2015. Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: a review. *Chemosphere*, 140: 119–128
65. Hong E., Yeneh, A.M., Kayaalp A., Sen T.K., Ang H.M., Kayaalp M. 2016. Rheological characteristic of municipal thickened excess activated sludge (TEAS): impacts of pH, temperature, solid concentration and polymer dose. *Res. Chem. Intermediat.*, 42: 6567–6585
66. Ikeda-Ohtsuda W., Miyahara M., Kim S.W., Yamada T., Matsuoka M., Watanabe A., Fushinobu S., Wakagi T., Shoun H., Miyauchi K., Endo G. 2013. Bioaugmentation of a wastewater bioreactor system with the nitrous oxide-reducing denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain TR2. *J. Biosci. Bioeng.*, 15: 37–42
67. Järvik, O., Kamenev, S., Kasemets, K., Kamenev, I. 2010. Effect of ozone on viability of activated sludge detected by oxygen uptake rate (OUR) and adenosine-5'-triphosphate (ATP) measurement. *Ozone Sci. Eng.*, 32: 408–416
68. Ji J., Kakade A., Zhang R., Zhao S., Khan A., Liu P., Li X. 2019. Alcohol ethoxylate degradation of activated sludge is enhanced by bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. LZ-B. *Ecotoxicol. Environ. Safe.*, 169: 335–343
69. Jiang H.L., Tay J.H., Maszenian A.M., Tay S.T.L. 2006. Enhanced phenol biodegradation and aerobic granulation by two coaggregating bacterial strains. *Environ. Sci. Technol.*, 40: 6137–6142
70. Joshi H., Dave R., Venugopalan V.P. 2014. Pumping iron to keep fit: modulation of siderophore secretion helps efficient aromatic utilization in *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbiology*, 160: 1393–1400
71. Kalka J. 2012. Landfill leachate toxicity removal in combined treatment with municipal wastewater. *Sci. World J.*, 2012: 1–7
72. Kapelewska J., Kotowska U., Wiśniewska K. 2016. Determination of personal care products and hormones in leachate and groundwater from Polish MSW landfills by ultrasound-assisted emulsification microextraction and GC-MS. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 23: 1642–1652
73. Kim I.S., Ekpeghere K., Ha S.Y., Kim S.H., Kim B.S., Song B., Chun J., Chang J.S., Kim H.G., Koh S.C. 2013. An eco-friendly treatment of tannery wastewater using bioaugmentation with a novel microbial consortium. *J. Environ. Sci. Health A*, 48: 1732–1739
74. Kos B., Šušković J., S., Vuković S., Šimpraga M., Frece J., Matošić S. 2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.*, 94: 981–987

75. Kozdrój J. 2000. Microflora of technogenous wastes characterized by fatty acid profiling. *Microb. Res.*, 155: 149–156
76. Kumar D., Alappat B.J. 2005a. Analysis of leachate pollution index and formulation of sub-leachate pollution indices. *Waste Manag. Res.*, 23: 230–239
77. Kumar D., Alappat B.J. 2005b. Evaluating leachate contamination potential of landfill sites using leachate pollution index. *Clean Technol. Environ.*, 7: 190–197
78. Kurane R., Hatamochi K., Kakuno T., Kiyohara M., Hirano M., Taniguchi Y. 1994. Production of a bioflocculant by *Rhodococcus erythropolis* S-1 grown on alcohols. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58: 428–429
79. Lakshmanan V., Shantharaj D., Li G., Seyfferth A.L., Sherrier J.D., Bais H.P. 2015. A natural rice rhizospheric bacterium abates arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 4: 1037–1050
80. Laner D., Crest M., Scharff H., Morris, J. W.F., Barlaz M.A. 2012. A review of approaches for the long-term management of municipal solid waste landfills. *Waste Manag.*, 32: 498–512
81. Li C., Zhu L., Pan D., Li S., Xiao H., Zhang Z., Shen X., Wang Y., Long M. 2019. Siderophore-mediated iron acquisition enhances resistance to oxidative and aromatic compound stress in *Cupriavidus necator* JMP134. *Appl. Environ. Microbiol.*, 85: e01938-18
82. Li X.Z., Zhao Q.L. 1999. Inhibition of microbial activity of activated sludge by ammonia in leachate. *Environ. Int.*, 25: 961–968
83. Lim J.W., Tan J.Z., Seng C.E. 2013. Performance of phenol-acclimated activated sludge in the presence of various phenolic compound. *Appl. Water Sci.*, 3: 515–525
84. Lin Y., Wang L., Chi Z.M., Liu X.Y. 2008. Bacterial alginate role in aerobic granular bio-particles formation and settleability improvement. *Sep. Sci. Technol.*, 43: 1642–1652
85. Lippi, M., Bellas, M.B.R.G., Mendez, G.P., Cardoso, R.A.F. 2018. State of art of landfill leachate treatment: literature review and critical evaluation. *Ciência e Natura J.*, 40
86. Liu X., Chen Y., Zhang X., Wang L. 2015. Aerobic granulation strategy for bioaugmentation of a sequencing batch reactor (SBR) treating high strength pyridine wastewater. *J. Hazard. Mater.*, 15: 153–160
87. Liu X.W., Sheng G.P., Yu H.Q. 2009. Physicochemical characteristics of microbial granules. *Biotechnol. Adv.*, 27: 1061–1070
88. Liwarska-Bizukojc W., Andrzejczak O., Solecka M. 2019. Study on activated sludge flocs morphology and composition in a full-scale wastewater treatment plant in Poland. *Environ. Prot. Eng.*, 45: 69-82
89. Ma F., Guo J., Zhao L., Chang C., Cui D. 2009. Application of bioaugmentation to improve the activated sludge system into the contact oxidation system treating petrochemical wastewater. *Bioresour. Technol.*, 100: 597–602
90. Malik A., Sakamoto M., Hanazaki S., Osawa M., Suzuki T., Tochigi M., Kakii K. 2003. Coaggregation among nonflocculating bacteria isolated from activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 6056–6063
91. Marchlewicz A., Domaradzka D., Guzik U., Wojcieszynska D. 2016. *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) is a gram-positive bacterium able to degrade naproxen and ibuprofen. *Water Air Soil Pollut.*, 227: 1-8
92. Martínez-Martínez M., Lores I., Peña-García C., Bargiela R., Reyes-Duarte D., Guazzaroni M.E., Peláez A.I., Sánchez J., Ferrer M. 2014. Biochemical studies on a versatile esterase that is most catalytically active with polyaromatic esters. *Microb. Biotechnol.*, 7: 184–191
93. Matejczyk M., Płaza G., Nałęcz-Jawecki G., Ulfig K., Markowska-Szczupak A. 2011. Estimation of the environmental risk posed by landfills using chemical, microbiological and ecotoxicological testing of leachates. *Chemosphere*, 82: 117-123

94. Matz C., Bergfeld T., Rice S.A., Kjelleberg S. 2004. Microcolonies, quorum sensing and cytotoxicity determine the survival of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to protozoan grazing. *Environ. Microbiol.*, 6: 218–226
95. Michalska J., Piński A., Żur J., Mroziak A. 2020a. Selecting bacterial candidates for the bioaugmentation of activated sludge to improve the aerobic treatment of landfill leachate. *Water*, 12 (1): 1-26
96. Michalska J., Piński A., Żur J., Mroziak A. 2020b. Analysis of the bioaugmentation potential of *Pseudomonas putida* OR45a and *Pseudomonas putida* KB3 in the sequencing batch reactors fed with the phenolic landfill leachate. *Water*, 12: 1-21
97. Michalska J., Greń I., Żur J., Wasilkowski D., Mroziak A. 2019. Impact of the biological cotreatment of the Kalina pond leachate on laboratory sequencing batch reactor operation and activated sludge quality. *Water*, 11: 1-24
98. Michalska J., Greń I., Mroziak A. 2018. Cele, strategie i ocena efektywności bioaugmentacji osadu czynnego zdefiniowanymi mikroorganizmami w usuwaniu toksycznych związków chemicznych. *Post. Mikrobiol.*, 57(2): 125-137
99. Michalska J. Mroziak A. 2018. Zastosowanie bioaugmentacji w procesach biologicznego oczyszczania ścieków i utylizacji osadów. *Ochr. Sr.*, 40(1): 35-44
100. Michalska J., Wojcieszewska D., Greń I. 2016. Investigation of functional diversity and activated sludge condition using Biolog® system. *ACEE J.*, 1: 119–126
101. microbesng.uk
102. Miksch K. 1977. Application of dehydrogenase activity determinations in biodegradation of refinery sewage. *Gas Water Civ. Technol.*, 51: 234–235
103. Monsalvo V.M., Tobajas M., Mohedano A. F., Rodriguez J.J. 2012. Intensification of sequencing batch reactors by cometabolism and bioaugmentation with *Pseudomonas putida* for the biodegradation of 4-chlorophenol. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 87: 1270–1275
104. More T.T., Yadav J.S.S., Yan S., Tyagi R.D., Surampalli R.Y. 2014. Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. *J. Environ. Manage.*, 144: 1–25
105. Moretti G., Matteucci F., Ercole C., Vegliò F., Del Gallo M. 2015. Microbial community distribution and genetic analysis in a sludge active treatment for a complex industrial wastewater: a study using microbiological and molecular analysis and principal component analysis. *Ann. Microbiol.*, 66: 397–405
106. Morris S., Garcia-Cabellos G., Enright D., Dyan D., Enright A.M. 2018. Bioremediation of landfill leachate using isolated bacterial strains. *Int. J. Environ. Bioremediat. Biodegrad.*, 6: 26-35
107. Murinová S., Dercová K. 2014. Response mechanisms of bacterial degraders to environmental contaminants on the level of cell walls and cytoplasmic membrane. *Int. J. Microbiol.*, 2014: 873081
108. Neczaj E., Kacprzak M., Lach J., Okoniewska E. 2007. Effect of sonication on combined treatment of landfill leachate and domestic sewage in SBR reactor. *Desalination*, 204: 227-233
109. Nguyen P.Y., Carvalho G., Reis A.C., Nunes O.C., Reis M.A.M., Oehmen A. 2017. Impact of biogenic substrates on sulfamethoxazole biodegradation kinetics by *Achromobacter denitrificans* strain PR1. *Biodegradation*, 28: 205–217
110. Nowak A., Mroziak A. 2018. Degradation of 4-chlorophenol and microbial diversity in soil inoculated with single *Pseudomonas* sp. CF600 and *Stenotrophomonas maltophilia* KB2. *J. Environ. Manage.*, 215: 216–229
111. Oviedo M.D.C, Barragán Sánchez J., Alonso J.M.Q. 2009. A new approach to toxicity determination by respirometry. *Environ. Technol.*, 30: 1601-1605
112. Pacwa-Płociniczak M., Płociniczak T., Iwan J., Zarska M., Chorążewski M., Dzida M., Piotrowska-Seget Z. 2016. Isolation of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing bacteria and assessment their plant growth-promoting traits. *J. Environ. Manag.*, 168: 175–184

113. Pacwa-Płociniczak M., Płaza G.A., Poliwoda A., Piotrowska-Seget Z. 2014. Characterization of hydrocarbondegrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 21: 9385–9395
114. Pala A., Erden G. 2004. Chemical pretreatment of landfill leachate discharged into municipal biological treatment systems. *Environ. Eng. Sci.*, 21: 549–557
115. Peleg M., Corradini M.G., Normand M.D. 2007. The logistic (Verhulst) model for sigmoid microbial growth curves revisited. *Food Res. Int.*, 40: 808–818
116. Pieczykolan B., Płonka I., Kosel M. 2016. Changes of the quality of activated sludge during the biological treatment of landfill leachate. *Environ. Prot. Eng.*, 42: 33–42
117. Piotrowski R., Paul A., Lewandowski M. 2019. Improving SBR performance alongside with cost reduction through optimizing biological processes and dissolved oxygen concentration trajectory. *Appl. Sci.*, 9: 1–15
118. Pistelok F., Pohl A., Wiera B., Stuczyński T. 2016. Using the ATP test in wastewater treatment in the Silesia province. *Environ. Prot. Eng.*, 42: 17–32
119. Polska Norma PN-73/C-04576/06:1973. Woda i ścieki. Badania zawartości związków azotu - oznaczanie azotu azotynowego metodą kolorymetryczną z zastosowaniem kwasu sulfanilowego i α -naftyloaminy. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa 1973
120. Polska Norma PN-ISO 7150-1:2002. Jakość wody. Oznaczanie azotu amonowego. Część 1. Manualna metoda spektrometryczna. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa 2002
121. Polska Norma PN-ISO 10390:1997. Jakość gleby. Oznaczanie pH. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa 1997
122. Polska Norma PN-C-04576-4:1994. Woda i ścieki. badania zawartości związków azotu - oznaczanie azotu amonowego przez bezpośrednią destylację. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa 1994
123. Polska Norma PN-ISO 6439:1994. Jakość wody. Oznaczanie indeksu fenolowego. Metody spektrometryczne z 4-aminoantypiryną po destylacji. Polski Komitet Normalizacyjny: Warszawa, Polska, 1994.
124. Polska Norma PN-82/C-04576/08:1982. Woda i ścieki. Badania zawartości związków azotu - oznaczanie azotu azotanowego metodą kolorymetryczną z zastosowaniem salicylanu sodu. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa 1982
125. Ranjan K., Chakraborty S., Verma M., Iqbal J., Kumar R.N. 2016. Co-treatment of old landfill leachate and municipal wastewater in sequencing batch reactor (SBR): effect of landfill leachate concentration. *Water Qual. Res. J.*, 51: 377–387
126. Ren Y., Ferraz F., Kang A.J., Yuan Q. 2017. Treatment of old landfill leachate with high ammonium content using aerobic granular sludge. *J. Biol. Eng.*, 11: 1–8
127. Rojas A., Duque E., Mosqueda G., Golden G., Hurtado A., Ramos J.L., Segura A. 2001. Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.*, 183: 3967–3973
128. Röling W.F., van Breukelen B.M., Braster M., van Verseveld H.W. 2000. Linking microbial community structure to the pollution: Biolog-substrate utilization in and near a landfill leachate plume. *Water Sci. Technol.*, 41: 47–53
129. Saraswathi R., Saseetharan M.K. 2010. Effects of temperature and pH on floc stability and biodegradation in paper. *J. Eng. Res. Stud.*, 1: 166–176
130. Schumacher T.E., Eynard A., Chintala R. 2015. Rapid cost-effective analysis of microbial activity in soils using modified fluorescein diacetate method. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 22: 4759–4762
131. Scott J., Beydoun D., Amal R., Low G., Cattle J. 2005. Landfill management, leachate generation, and leach testing of solid wastes in Australia and overseas. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.*, 35: 239–332

132. Sipma J., Osuna M.B., Emanuelsson, M.A.E., Castro P.M.L. 2010. Biotreatment of industrial wastewaters under transient-state conditions: process stability with fluctuations of organic load, substrates, toxicants, and environmental parameters. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.*, 40: 147–197
133. Son K.S., Hall E.R. 2003. Use of a similarity index based on microbial fatty acid (MFA) analysis to monitor biological wastewater treatment systems. *Environ. Technol.*, 24: 1147–1155
134. Song Z., Ning T., Chen Y., Cheng X., Ren N. 2013. Bioaugmentation of aerobic granular sludge with the addition of a bioflocculant-producing consortium. *Adv. Mater. Res.*, 726: 2530–2535
135. Stasinakis A.S., Mamais D., Thomaidis N.S., Lekkas T.D. 2002. Effect of chromium (VI) on bacterial kinetics of heterotrophic biomass of activated sludge. *Water Res.*, 36: 3341–3349
136. Szymańska-Pulikowska A. 2010. Ocena właściwości wód odciekowych z krajowych składowisk odpadów komunalnych. *Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejskich*, 8: 141-149
137. Taghadosi R., Shakibbaie M.R., Masoumi S. 2015. Biochemical detection of N-Acyl homoserine lactone from biofilmforming uropathogenic *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection samples. *Rep. Biochem. Mol. Biol.*, 3: 56–61
138. Taş N., Brandt B.W., Braster M., Van Breukelen B.M., Röling W.F.M. 2018. Surface landfill leachate contamination affects metabolic potential and gene expression in the Banisveld aquifer. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 94: 1–12
139. Tawila Z.M.A., Ismail S., Dadrasnia A., Usman M.M. 2018. Production and characterization of a bioflocculant produced by *Bacillus salmalaya* 139SI-7 and its applications in wastewater treatment. *Molecules*, 23: 2689
140. Tkaczyk A.M., Pietrzak M., Kołak G. 2005. Case of the environment reclamation in the region of Kalina Pond in Świętochłowice. *Pol. Geol. Inst. Spec. Pap.*, 17: 77–83
141. Ustawa z 20 lipca 2017 roku Prawo Wodne (Dz. U. 2017, poz. 1566)
142. Vural C., Vural C., Ozdemir G. 2020. Monitoring of the degradation of aromatic hydrocarbons by bioaugmented activated sludge. *J. Chem. Technol. Biot.*, 95: 52-62
143. Wang J., He H., Wang M., Wang S., Zhang J., Wei W., Xu H., Lv Z., Shen D. 2013. Bioaugmentation of activated sludge with *Acinetobacter* sp. TW enhances nicotine degradation in a synthetic tobacco wastewater treatment system. *Bioresour. Technol.*, 142: 445–453
144. Wang L.K., Shammas N.K., Hung J. Advanced biological treatment processes. Humana Press: New York, USA, 2010
145. Wick L.Y., Pasche N., Bernasconi S.M., Pelz O., Harms, H. 2003. Characterization of multiple-substrate utilization by anthracene-degrading *Mycobacterium frederiksbergense* LB501T. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 6133–6142
146. Wrześniak A., Kopyczok J. Ocena stanu środowiska w rejonie obiektów objętych monitoringiem lokalnym, na terenie województwa śląskiego. Biblioteka Monitoringu Środowiska, Katowice, 2012
147. Xenofontos E., Tanase A-M., Stoica I., Vyrides I. 2016. Newly isolated alkalophilic *Advenella* species bioaugmented in activated sludge for high *p*-cresol removal. *New Biotechnol.*, 33: 305–310
148. Xia Y., Wen X., Zhang B., Yang Y. 2018. Diversity and assembly patterns of activated sludge microbial communities: a review. *Biotechnol. Adv.*, 36: 1038–1047
149. Xiao S., Peng J., Song Y., Zhang D., Liu R., Zeng P. 2013. Degradation of biologically treated landfill leachate by using electrochemical process combined with UV irradiation. *Sep. Purif. Technol.*, 117: 24-29
150. Yan C.S. Research Method for Soil Fertility. Agriculture Press, Beijing, China, 1988
151. Yao Y., Lu Z., Zhu F., Min H., Bian C. 2013. Successful bioaugmentation of an activated sludge reactor with *Rhodococcus* sp. YYL for efficient tetrahydrofuran degradation. *J. Hazard. Mater.*, 261: 550–558

152. Yu D., Yang J., Teng F., Feng L., Fang X., Ren H. 2014. Bioaugmentation treatment of mature landfill leachate by new isolated ammonia nitrogen and humic acid resistant microorganism. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 987–997
153. Yu Z., Mohn W.W. 2002. Bioaugmentation with the resin acid-degrading bacterium *Zoogloea resiniphila* DhA-35 to counteract pH stress in an aerated lagoon treating pulp and paper mill effluent. *Water Res.*, 36: 2793–2801
154. Zhang C.L., Lin B., Xia S.Q., Wang X.J., Yang A.M. 2007. Production and application of a novel biofloculant by multiple-microorganism consortia using brewery wastewater as carbon source. *J. Environ. Sci.*, 19: 667–673
155. Zhang Q.Q., Yang G.F., Zhang L., Zhang Z.Z., Tian G.M., Jin R.C. 2017. Bioaugmentation as a useful strategy for performance enhancement in biological wastewater treatment undergoing different stresses: application and mechanisms. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 47: 1877–1899
156. Zheng M., Li S., Dong Q., Huang X., Liu Y. 2019. Effect of blending landfill leachate with activated sludge on the domestic wastewater treatment process. *Environ. Sci. Wat. Res. Technol.*, 5: 268–276
157. Zubrowska-Sudol M., Walczak J. 2014. Effects of mechanical disintegration of activated sludge on the activity of nitrifying and denitrifying bacteria and phosphorus accumulating organisms. *Water Res.*, 61: 200–209

II. Publikacje wchodzące w skład rozprawy

II.1

Michalska J., Greń I., Mrozik A. 2018. Cele, strategie i ocena efektywności bioaugmentacji osadu czynnego zdefiniowanymi mikroorganizmami w usuwaniu toksycznych związków chemicznych. *Postępy Mikrobiologii*, 57(2): 125-137

CELE, STRATEGIE I OCENA EFEKTYWNOŚCI BIOAUGMENTACJI OSADU CZYNNEGO ZDEFINIOWANYMI MIKROORGANIZMAMI W USUWANIU TOKSYCZNYCH ZWIĄZKÓW CHEMICZNYCH

Justyna Michalska*, Izabela Greń, Agnieszka Mrozik

Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski, Katowice

Wpłynęło w sierpniu, zaakceptowano w grudniu 2017 r.

Streszczenie: Technologia konwencjonalnego osadu czynnego stanowi obecnie jedną z najpowszechniej stosowanych metod w systemach biologicznego oczyszczania ścieków. Jej stosunkowo nową alternatywą jest technologia tlenowego granulowanego osadu czynnego, zapewniająca intensyfikację usuwania zanieczyszczeń i bardziej korzystna ekonomicznie. Współczesne oczyszczalnie ścieków coraz częściej bywają narażone na wysoki ładunek toksycznych i opornych na rozkład zanieczyszczeń chemicznych dopływających w ściekach. Mikroorganizmy naturalnie obecne w osadzie czynnym często nie są jednak zdolne do wykorzystywania tych złożonych związków chemicznych jako źródeł węgla i energii. Zastosowanie bioaugmentacji poprzez wprowadzenie do środowiska osadu czynnego wyselekcjonowanych szczepów lub konsorcjów mikroorganizmów, w celu wzmocnienia potencjału degradacyjnego mikroorganizmów autochtonicznych, wydaje się być atrakcyjnym rozwiązaniem problemów wielu oczyszczalni ścieków, związanych z ich narażeniem na wysokie stężenia ksenobiotyków. Jednakże aby strategia ta mogła stanowić skuteczne narzędzie wspomagające funkcjonowanie osadu czynnego, kluczowym aspektem jest dobór odpowiednich mikroorganizmów do inokulacji. Wybrane do bioaugmentacji mikroorganizmy powinny charakteryzować się nie tylko wysokim potencjałem degradacyjnym w kierunku rozkładu wybranych zanieczyszczeń, ale również odznaczać się zdolnością do chemotaksji, bioflokulacji, agregacji, a także produkcji substancji egzopolisacharydowych, biosurfaktantów i autoinduktorów. Ponadto po wprowadzeniu do osadu czynnego powinny być one zdolne do wbudowywania się w strukturę kląskzków lub tworzenia granul. Bioaugmentacja osadu czynnego może być prowadzona z udziałem zarówno pojedynczych szczepów bakterii i grzybów, konsorcjów bakteryjnych i grzybowych, a także mieszanych konsorcjów mikroorganizmów. W oczyszczalniach ścieków wykorzystuje się natomiast w tym celu przede wszystkim komercyjnie dostępne preparaty handlowe. Mniej powszechna jest inokulacja osadu czynnego mikroorganizmami genetycznie modyfikowanymi, z obawy na ich niekontrolowany transfer do środowiska. Liczne badania wskazują, iż bioaugmentacja osadu czynnego może stanowić skuteczną strategię eliminacji związków ze ścieków toksycznych, takich jak fenol i jego pochodne, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, barwniki, farmaceutyki i wiele innych.

Wprowadzenie. 2. Bioaugmentacja osadu czynnego. 3. Selekcja mikroorganizmów do bioaugmentacji osadu czynnego. 3.1. Pojedyncze szczepy bakterii. 3.2. Pojedyncze szczepy grzybów mikroskopowych. 3.3. Konsorcja mikroorganizmów. 3.4. Mikroorganizmy modyfikowane genetycznie. 3.5. Biopreparaty handlowe. 4. Podsumowanie

Objectives, strategies and evaluation of the effectiveness of activated sludge bioaugmentation with defined microorganisms in the removal of toxic chemicals

Abstract: Among the currently used biological wastewater treatment systems, the conventional floccular-sludge method has been the most common. Its relatively novel alternative is aerobic granular activated sludge, which offers numerous operational and economic advantages. Although the activated sludge for modern wastewater treatment is often exposed to high concentrations of diverse chemicals, particularly inhibitory and recalcitrant ones, its autochthonous microorganisms may not be familiar with these compounds and can not use them as carbon and energy sources. For this reason, bioaugmentation, defined as a method for improvement of the degradative capacity of contaminated environment by adding selected strains or consortia of microorganisms, seems to be an attractive solution to overcome the problems associated with the exposure of sewage plants to high concentrations of xenobiotics. The most important step in the achievement of successful bioaugmentation is the selection of proper microorganisms with desirable abilities. They should be characterized by high degradative potential towards specific pollutant(s), ability to form biofilm, aggregation and production of extracellular polymeric substances, bioflocculating activity, motility, biosurfactants and autoinductors synthesis. Moreover, they should survive after inoculation into the activated sludge and possess the ability to incorporate into the flocs or form granules. In bioaugmentation of the activated sludge, several approaches can be distinguished – bioaugmentation with: single strains of bacteria or fungi, consortia of bacteria, consortia of fungi or mixed consortia, genetically modified microorganisms and commercial formulations. As many studies have indicated, bioaugmentation is an effective technology for eliminating from sewage toxic compounds, such as phenols and its derivatives, polycyclic aromatic hydrocarbons, dyes, pharmaceuticals and many others.

1. Introduction. 2. Bioaugmentation of activated sludge. 3. Selection of microorganisms for bioaugmentation of activated sludge. 3.1. Single strains of bacteria. 3.2. Single strains of filamentous fungi. 3.3. Consortia of microorganisms. 3.4. Genetically modified microorganisms. 3.5. Commercial formulations. 4. Summary

Słowa kluczowe: bioaugmentacja, mikroorganizmy, osad czynny, zanieczyszczenia

Key words: bioaugmentation, microorganisms, activated sludge, pollutants

* Autor korespondencyjny: Justyna Michalska, Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice; tel. 32 20 09 555; e-mail: jmichalska@us.edu.pl

Cele, strategię i ocenę efektywności bioaugmentacji osadu czynnego zdefiniowanymi mikroorganizmami w usuwaniu toksycznych związków chemicznych

1. Wprowadzenie

Gwałtowny przyrost liczby ludności oraz postępujące procesy urbanizacji i rozwoju przemysłu, jak również intensyfikacja rolnictwa przyczyniają się do znacznego wzrostu poziomu toksycznych substancji w ściekach. Związki te często odznaczają się wysoką trwałością, nie są podatne na rozkład biologiczny i w niskich stężeniach działają toksycznie na organizmy żywe. Narastające skażenie ścieków ksenobiotykami stanowi obecnie bardzo poważny problem środowiskowy nie tylko w Polsce, ale i na całym świecie [66].

Wśród substancji toksycznych, których stężenie w ściekach stale wzrasta, znajdują się przede wszystkim jednopierścieniowe węglowodory aromatyczne, w tym fenol i jego pochodne [6], benzen, etylobenzen oraz izomery ksyleny (BTEX) [12], wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), metale ciężkie [1], chloroform, cyjanek i tiocyjanian [45] oraz kwasy żywiczone [8]. Nową grupę zanieczyszczeń w ściekach, których stężenia systematycznie wzrastają stanowią farmaceutyki, w tym głównie antybiotyki, niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ), betablokery, biomimetyki hormonalne oraz środki ochrony osobistej [44].

Obecnie wśród powszechnie stosowanych systemów biologicznego oczyszczania ścieków w warunkach tlenowych dominuje metoda konwencjonalnego osadu czynnego (KOC). W technologii tej zanieczyszczenia mineralizowane są przez różne grupy mikroorganizmów połączonych ze sobą w struktury, zwane kłaczkami [63]. Mikroorganizmy naturalnie występujące w osadzie czynnym często nie są zdolne do wykorzystywania toksycznych związków jako źródeł węgla i energii, zwłaszcza jeśli występują one w postaci złożonych mieszanin, i jednocześnie mogą być bardzo wrażliwe na ich ekspozycję. Prowadzi to do zaburzeń w funkcjonowaniu osadu, związanych z obniżeniem aktywności i bioróżnorodności mikroorganizmów oraz spadku liczebności pierwotniaków, istotnych dla prawidłowego funkcjonowania tego ekosystemu. W konsekwencji tych zjawisk może dojść do osłabienia, a nawet całkowitego zahamowania procesu biologicznego oczyszczania ścieków [5, 54]. Oczyszczanie ścieków bywa również utrudnione ze względu na wysoki ładunek toksycznych zanieczyszczeń, brak substancji biogennych, zmienną wartość odczynu pH, a także zasolenie [16, 67, 76]. Konwencjonalne oczyszczalnie ścieków często nie są przystosowane do eliminacji związków chemicznych o złożonej strukturze, dlatego też wiele z nich w zmienionej postaci lub w formie równie toksycznych

metabolitów pośrednich co związek wyjściowy przedostaje się do gleby, wód powierzchniowych i głębinowych [10, 14, 54].

Stosunkowo nowym i bardzo obiecującym rozwiązaniem zapewniającym intensyfikację usuwania zanieczyszczeń organicznych i substancji biogennych ze ścieków jest technologia tlenowego granulowanego osadu czynnego (TGOC) [50, 56, 62]. Osad granulowany ma postać agregatów powstających w wyniku samoimmobilizacji mikroorganizmów w określonych warunkach panujących w reaktorze. Granule osadu charakteryzują się lepszymi zdolnościami sedymentacyjnymi niż tradycyjny osad czynny w postaci kłaczków, co zapewnia wysokie stężenie biomasy w reaktorze. Ponadto granule w przeciwieństwie do kłaczków nie podlegają zjawisku pęcznienia, są bardziej odporne na duże wahania obciążenia i nierównomierność dopływu ścieków, zapewniają lepsze wykorzystanie rozpuszczalnego tlenu i znacznie ograniczają produkcję osadu nadmiernego. Dzięki zróżnicowanemu składowi gatunkowemu oraz zróżnicowanym warunkom tlenowym w strukturze granul, można uzyskać wysoką wydajność eliminacji zanieczyszczeń ze ścieków. Technologia TGOC ma udokumentowaną przewagę nad KOC i została wdrożona już w ponad 20 oczyszczalniach ścieków komunalnych i przemysłowych na świecie (m.in. w Portugalii, Holandii, Wielkiej Brytanii i Polsce) pod nazwą Technologii Nereda® [15, 36, 39]. Z uwagi na to, że nie do końca poznane są wszystkie mechanizmy warunkujące proces granulacji osadu, nadal trwają intensywne prace mające na celu poszukiwanie strategii przyspieszających proces tworzenia granul oraz zapewniających utrzymanie ich struktury w czasie ciągłej pracy reaktora.

Celem pracy było dokonanie przeglądu najnowszych osiągnięć w zakresie różnych strategii bioaugmentacji konwencjonalnego i granulowanego osadu czynnego wyselekcjonowanymi mikroorganizmami w eliminacji toksycznych związków chemicznych ze ścieków oraz ocena wydajności tego procesu.

2. Bioaugmentacja osadu czynnego

Atrakcyjne rozwiązanie problemów towarzyszących narażeniu wielu oczyszczalni ścieków na wysokie stężenia toksycznych zanieczyszczeń stanowi metoda bioaugmentacji [42, 48]. Polega ona na wprowadzeniu do środowiska osadu czynnego wyspecjalizowanych szczepów lub konsorcjów mikroorganizmów zdolnych do rozkładu złożonych związków chemicznych i zarazem opornych na ich wysokie stężenia, co w konsekwencji prowadzi do zwiększenia efektywności usuwania zanieczyszczeń ze ścieków [41, 54]. Mikroorganizmy o pożądanym cechach degradacyjnych pozyskuje się do bioaugmentacji poprzez ich selekcję z tego samego

lub innego źródła o identycznym lub podobnym typie zanieczyszczeń, a następnie namnaża się je w warunkach laboratoryjnych [10, 46, 76, 82]. Do skażonego osadu czynnego można również wprowadzić mikroorganizmy genetycznie modyfikowane o wzmożonej aktywności degradacyjnej względem konkretnego związku [4]. Inną strategią jest stosowanie do bioaugmentacji komercyjnych biopreparatów, zawierających zdefiniowane konsorcja mikroorganizmów i/lub enzymy czy biosurfaktanty. Wprowadzenie wyselekcjonowanych mikroorganizmów do osadu czynnego może nie tylko wspomagać eliminację trudno rozkładalnych zanieczyszczeń ze ścieków, ale również usprawniać proces usuwania związków azotu i fosforu oraz poprawiać właściwości flokulacyjne osadu [17, 37].

Aplikacyjne wykorzystanie bioaugmentacji w osadzie czynnym nie jest powszechne, ze względu na trudny do przewidzenia los mikroorganizmów inokulowanych do tego środowiska. Introdukowane do osadu bakterie są podatne na wpływ różnych czynników, między innymi na żerowanie pierwotniaków, wymywanie wraz ze ściekami i złożone interakcje z mikroorganizmami autochtonicznymi [3, 27, 49, 78, 79]. Aby metoda bioaugmentacji mogła stanowić skuteczne narzędzie w zwiększaniu efektywności usuwania zanieczyszczeń i wspomagające funkcjonowanie osadu czynnego, kluczowym aspektem jest dobór odpowiednich mikroorganizmów do inokulacji.

3. Selekcja mikroorganizmów do bioaugmentacji osadu czynnego

Etap selekcji drobnoustrojów o potencjalnym znaczeniu w bioaugmentacji osadu czynnego polega na zbadaniu i ocenie ich potencjału degradacyjnego w kierunku rozkładu wybranych zanieczyszczeń. Równie istotna jest charakterystyka wyselekcjonowanych mikroorganizmów pod kątem cech pozwalających na ich inkorporację w strukturę kłaczków i granul, co zapewnia im ochronę przed atakiem pierwotniaków, ułatwia pobieranie substancji odżywczych i pozwala na egzystencję w tym ekosystemie. Wybrane do bioaugmentacji szczepy bakterii powinny cechować się zdolnościami do agregacji i adhezji, odgrywającymi kluczową rolę w procesie formowania kłaczków i granul [53]. Badania Liu i wsp. [37] wskazują na przykład, że zdolność do agregacji szczepu *Rhizobium* sp. NJUST 18 inokulowanego do sekwencyjnego reaktora biologicznego (SBR) istotnie wpłynęła na poprawę procesu granulacji osadu czynnego. Podobnie Monsalvo i wsp. [46] stwierdzili, że szczep *Pseudomonas putida* inokulowany do osadu czynnego obciążonego 4-chlorofenolem (4-CP) przeżywał w nim przez okres trzech miesięcy, co wynikało z jego zdolności do tworze-

nia agregatów w obecności 4-CP oraz zmiany morfologii komórek z formy wydłużonej (*bacillus*) na formę kulistą (*coccus*).

Inną pożądaną cechą mikroorganizmów stosowanych w bioaugmentacji osadu czynnego są ich zdolności do produkcji macierzy egzopolisacharydowej (EPS), otaczającej komórki bakterii [64]. Wydzielanie substancji polisacharydowych przez mikroorganizmy nie tylko wspomaga wzajemną agregację komórek, wpływając na ich fizykochemiczne właściwości (strukturę, ładunek powierzchniowy, zdolność do flokulacji i adsorpcji), ale także chroni je przed czynnikami środowiskowymi, np. żerowaniem pierwotniaków, związkami antymikrobiologicznymi, biocydami oraz wysokimi stężeniami toksycznych substancji [52]. Obecne w strukturze macierzy egzopolisacharydowej regiony hydrofobowe i liczne anionowe grupy funkcyjne (np. karboksylowe, fosforylowe, sulfhydrylowe, fenylowe i hydroksylowe) pośredniczą nie tylko w akumulacji składników odżywczych, ale także znajdujących się w ściekach zanieczyszczeń, w tym metali ciężkich [47, 65]. Gupta i Thakur [19] udowodnili doświadczalnie, że skuteczność usuwania zanieczyszczeń ze ścieków inokulowanych szczepem *Bacillus* sp. ISTVK1 była związana między innymi z jego zdolnością do wytwarzania dużej ilości polimerów zewnątrzkomórkowych.

Zdolność mikroorganizmów do komunikowania się ze sobą poprzez wydzielanie do otoczenia i rozpoznawanie cząsteczek sygnałowych, tzw. autoinduktorów, znana pod nazwą quorum sensing jest równie ważną cechą przy doborze szczepów do inokulacji osadu. Bakterie rozpoznając precyzyjnie naturę chemiczną autoinduktorów oraz ich progowe stężenie (wartość *quorum*) w środowisku wzrostu, są w stanie reagować na zachodzące w nim zmiany poprzez indukcję ekspresji odpowiednich genów, kontrolujących ważne szlaki metaboliczne i określone procesy życiowe. W ten sposób mikroorganizmy mogą monitorować liczbę komórek oraz aktywność fizjologiczną całej populacji [80]. Zdolność mikroorganizmów do wydzielania autoinduktorów może wspomagać ich międzykomórkową komunikację z mikroorganizmami naturalnie występującymi w osadzie i w ten sposób umożliwiać skuteczne jego zasiedlanie. Wang i wsp. [73] wykazali, że szczep *Acinetobacter* sp. TW był zdolny do inkorporacji w strukturę KOC, obciążonego ściekami z przemysłu tytoniowego, dzięki produkcji krótkołańcuchowych acylowanych laktonów homoseryny (AHLs). Natomiast wydzielane przez bakterie do środowiska wzrostu AHLs z długim łańcuchem bocznym, były odpowiedzialne za ochronę komórek przed toksycznym działaniem obecnej w ściekach nikotyny.

Zdolność mikroorganizmów do chemotaksji odgrywa także istotną rolę w procesie oczyszczania ścieków. Rozpoznanie przez drobnoustroje gradientu stężenia

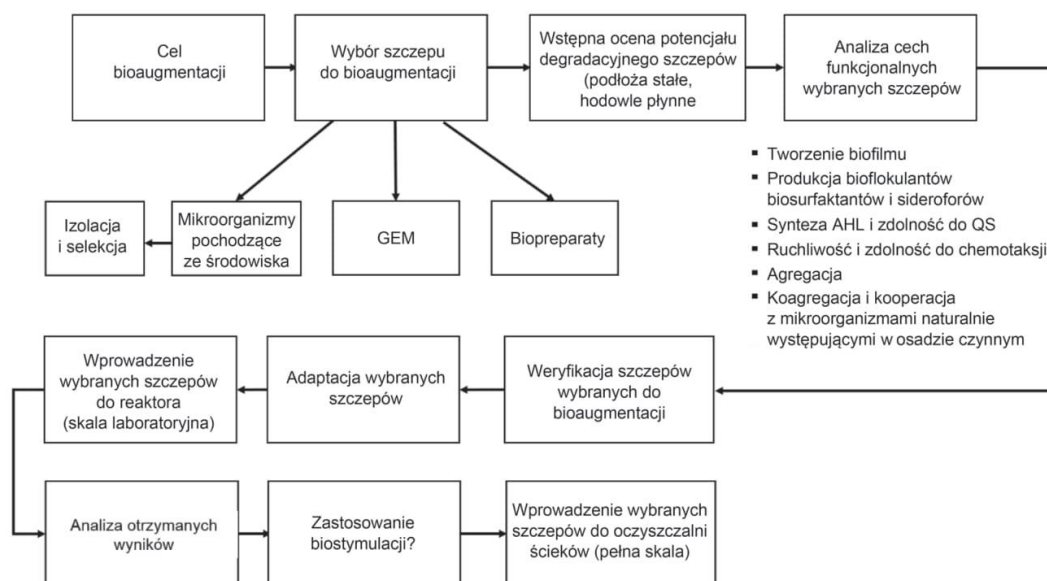
substancji chemicznych obecnych w ściekach wyzwała kaskadę przekazywania sygnału molekularnego, wpływając na modulowanie aktywności wici oraz ruchu bakterii w kierunku cząsteczek (atraktantów), odpowiedzialnych za stymulację tych procesów lub z dala od nich (repellentów). Chemotaksja może zatem wspomagać biodegradację zanieczyszczeń w ściekach lub stanowić mechanizm chroniący mikroorganizmy przed toksycznym wpływem ksenobiotyków, pozwalając im na przemieszczenie się do miejsc, gdzie panują bardziej sprzyjające warunki wzrostu. Ponadto mechanizm ten może wspomagać współzawodnictwo zdolnych do ruchu mikroorganizmów z innymi drobnoustrojami obecnymi w osadzie czynnym [9].

Ze względu na fakt, że mikrobiologiczny rozkład wielu ksenobiotyków może być utrudniony z powodu ich hydrofobowego charakteru i tym samym ograniczonej dostępności dla komórek mikroorganizmów, pożądaną cechą inokulantów do bioaugmentacji jest ich zdolność do syntezy związków powierzchniowo czynnych, zwanych biosurfaktantami. Związki te obniżają napięcie powierzchniowe oraz międzyfazowe, zwiększając w ten sposób powierzchnię zanieczyszczenia dostępną dla drobnoustrojów [8, 18]. Cirja i wsp. [10] wykazali, że wzrost wydajności rozkładu nonylofenolu (NF) w KOC wynikał ze zdolności inokulowanego szczepu *Sphingomonas* sp. TTNP3 do produkcji biosurfaktantów. Podobnie Chen i wsp. [8] wiązali wzrost poziomu usuwania związków żywicznych ze ścieków ze zdolnością szczepu *Gordonia* JW8 do produkcji biosurfaktantów i kwasów mikołowych.

Ważną cechą mikroorganizmów wyselekcjonowanych do bioaugmentacji osadu czynnego jest zdolność do syntezy związków polimerowych, tzw. bioflokulantów, wspomagających agregację komórek, a także immobilizację zanieczyszczeń zawieszonych w roztworze. Wprowadzanie do osadu czynnego takich mikroorganizmów może wpływać na skrócenie czasu jego granulacji oraz powstawanie bardziej stabilnych kłaczków. Potwierdzeniem tego zjawiska są wyniki badań Song'a i wsp. [69], którzy przeprowadzili w skali laboratoryjnej bioaugmentację KOC konsorcjum bakteryjnym złożonym ze szczepów *Devosia hwasunensis* i *Tetrasphaera elongata*, produkujących bioflokulanty. Guo i wsp. [17] wykazali także, że związki bioflokulujące syntetyzowane przez wprowadzone do oczyszczalni ścieków szczepy *Bacillus* sp. F2 i F6 przyczyniły się do wzrostu w tym środowisku bakterii z rodzaju *Zooglea*, odpowiedzialnych za spójność kłaczków, oraz poprawiły zdolności flokulacyjne osadu. Etapy selekcji mikroorganizmów oraz strategię bioaugmentacji osadu czynnego ilustruje rys. 1.

3.1. Pojedyncze szczepy bakterii

W ciągu ostatnich kilku lat przeprowadzono wiele badań dotyczących intensyfikacji rozkładu związków fenolowych, WWA, barwników, farmaceutyków, pestycydów czy związków ropopochodnych przez KOC i TOGC z wykorzystaniem pojedynczych szczepów bakterii (Tabela I). Xenofontos i wsp. [76] po inokulacji KOC, obciążonego 4-metylofenolem (4-MF) (750 mg/l), alkalofilnym szczepem *Advenella* sp. LVX4



Rys. 1. Etapy selekcji mikroorganizmów oraz strategię bioaugmentacji osadu czynnego

AHL – acyowane laktony homoseryny, QS – quorum sensing, GEM – genetycznie modyfikowane mikroorganizmy (opracowanie własne).

Tabela I

Pojedyncze szczepy bakterii w bioaugmentacji osadu czynnego obciążonego toksycznymi związkami chemicznymi w skali laboratoryjnej

Mikroorganizm	Źródło pochodzenia	Związek, mg/l	Ścieki/Podłoże/Rodzaj osadu	Źródło
<i>Comamonas testosteroni</i> bdq06	oczyszczalnia ścieków przemysłowych, Chiny	fenol, 290	ścieki z przemysłu farbiarskiego: ścieki komunalne (v/v; 1:2; 1:1; 2:1); KOC	[38]
		chinolina, 316		
<i>Advenella</i> sp. LVX4	gleba skażona olejem napędowym, Cypr	4-metylofenol, 750	podłoże mineralne; KOC	[76]
<i>Streptomyces</i> sp. QWE-35	oczyszczalnia ścieków z przeróbki węgla, Chiny	naftalen, 38,2	ścieki surowe; KOC	[77]
<i>Paracoccus denitrificans</i> W12	oczyszczalnia ścieków komunalnych, Chiny	pirydyna, 250–500	ścieki z przemysłu farmaceutycznego; KOC	[75]
<i>Bacillus cereus</i> HWBI	gleba skażona poliakrylamidem, Chiny	poliakrylamid, 100	podłoże mineralne; KOC	[74]
<i>Pseudomonas putida</i> CECT 4064	kolekcja szczepów, Hiszpania	fenol, 80–150	ścieki syntetyczne; KOC	[46]
		4-chlorofenol, 50		
<i>Pseudomonas</i> sp. JY2	oczyszczalnia ścieków petrochemicznych, Chiny	fenol, 550	podłoże mineralne, pH 10; KOC	[58]
<i>Pseudomonas putida</i> ONBA-17	oczyszczalnia ścieków komunalnych, Chiny	4-nitrobenzaldehyd, 100	ścieki syntetyczne; KOC	[79]
<i>Sphingomonas</i> sp. TTNP3	osad czynny, Belgia	nonylofenol, 0,220	ścieki syntetyczne; KOC	[10]
<i>Exiguobacterium</i> sp.	gleba z okolic fabryki farmaceutycznej, Chiny	Brilliant Scarlet GR, 700–1000	ścieki syntetyczne; KOC	[82]
<i>Pseudomonas</i> sp. HF-1	gleba skażona ściekami z przemysłu tytoniowego, Chiny	nikotyna, 40–250	ścieki z przemysłu tytoniowego: woda wodociągowa (v/v; 7:100); KOC	[72]
<i>Rhodococcus</i> sp. FP1	gleba skażona odciekami z przemysłu chemicznego, Portugalia	2-fluorofenol, 9–19	ścieki syntetyczne; TGOC	[12]
<i>Achromobacter</i> sp. QXH	mieszanka gleby i osadu czynnego	kwas 2,4-fenoksyoctowy, 144 i 565	ścieki syntetyczne bez dodatku lub z dodatkiem glukozy; TGOC	[60]

Objaśnienia: KOC – konwencjonalny osad czynny, TGOC – tlenowy granulowany osad czynny

stwierdzili całkowity rozkład tego związku w ciągu około 100 godzin. Natomiast mikroorganizmy w osadzie niebioaugmentowanym były zdolne do degradacji jedynie 44% wyjściowej dawki 4-MF. W innych badaniach Qu i wsp. [58] w wyniku bioaugmentacji KOC, silnie skażonego zasadowymi ściekami fenolowymi, z użyciem alkalofilnego szczepu *Pseudomonas* sp. JY2 wykazali, że obecność introdukowanych bakterii korespondowała ze wzrostem tempa usuwania hydroksybenzenu ze ścieków oraz poprawą zdolności flokulacyjnych osadu. W osadzie poddanym bioaugmentacji ubytek wyjściowego stężenia fenolu (550 mg/l) w ciągu 36 godzin wynosił 95%, natomiast w osadzie niebioaugmentowanym w tym samym czasie biodegradacji uległo 45% tego związku. Zakończoną sukcesem bioaugmentację KOC skażonego nonylofenolem (NF) (0,22 mg/l) z użyciem szczepu *Sphingomonas* sp. TTNP3 przeprowadzili także Cirja i wsp. [10]. Efektem wprowadzenia tej bakterii do środowiska osadu był nie tylko wzrost szybkości rozkładu NF w ściekach, ale również zmiana sposobu jego degradacji. Rozkładowi NF w osadzie poddanym bioaugmentacji towarzyszyło pojawienie się tylko jednego, nieszkodliwego metabolitu pośredniego

– hydrochinonu, natomiast w osadzie nieinokulowanym rozkład tego związku przebiegał z wytworzeniem mieszaniny różnych intermediatów o skróconych lub utlenionych łańcuchach alkilowych, wykazujących strukturalne podobieństwo do NF i mogących, podobnie jak on, wywoływać zaburzenia w funkcjonowaniu układu endokrynnego organizmów żywych.

Jednym ze związków aromatycznych, którego stężenie w ściekach nie podlega żadnej kontroli jest *o*-nitrobenzaldehyd (ONBA), stosowany w syntezie wielu związków chemicznych, w tym barwnika indygo oraz leku nifedypiny. Aby zbadać potencjalne zdolności szczepu *P. putida* ONBA-17 (znakowanego genem *gfp*) do rozkładu tego związku, Yu i wsp. [79] przeprowadzili bioaugmentację KOC obciążonego ONBA (100 mg/l). Stwierdzili istnienie pozytywnej korelacji pomiędzy wzrostem wprowadzonej bakterii a szybkością rozkładu tego związku. Całkowitą mineralizację ONBA w osadzie czynnym inokulowanym badanym szczepem uzyskali w ciągu 8 dni, natomiast dla porównania w osadzie kontrolnym, niepoddanym bioaugmentacji, w tym samym czasie rozkładowi uległo 24% początkowego stężenia tego związku. Introdukcja szczepu

P. putida ONBA-17 do osadu czynnego wpłynęła także na zwiększenie szybkości usuwania innych zanieczyszczeń organicznych ze ścieków.

Coraz częściej w ściekach wykrywa się obecność toksycznych, teratogennych oraz będących źródłem odoru N-heterocyklicznych związków aromatycznych, takich jak pirydyna, chinolina oraz ich pochodne. Często towarzyszą im również dimetyloformamid, alkohol 4-metoksybenzylowy, toluen, izopropanol oraz dichlormetan. Substancje te używane są do produkcji rozpuszczalników oraz środków farmaceutycznych lub powstają jako produkty uboczne przemysłu chemicznego i farmaceutycznego. Proces degradacji pirydyny (384 mg/l) w KOC obciążonym ściekami farmaceutycznymi i inokulowanym szczepem *Paracoccus denitrificans* W12 badali Wen i wsp. [75]. W ciągu 15 dni uzyskali prawie całkowitą mineralizację (97%) wyjściowego stężenia pirydyny w osadzie bioaugmentowanym bakteriami, podczas gdy w osadzie kontrolnym w tym czasie rozkładowi uległo 85% wprowadzonej dawki związku. Ponadto stwierdzili, że wyraźna dominacja szczepu *P. denitrificans* w bioaugmentowanym osadzie zmniejszała się wraz ze spadkiem stężenia pirydyny w ściekach i był on zastępowany przez bardziej wrażliwe na wysokie stężenia tego związku bakterie z rodzajów *Sphingobium*, *Comamonas* oraz *Hyphomicrobium*. W innych badaniach Liu i wsp. [38] bioaugmentowali KOC obciążony ściekami, pochodzącymi z przemysłu farbiarskiego, allochtonicznym szczepem *Comamonas testosteroni* bdq06 o wysokim potencjale degradacji fenolu oraz chinoliny. Wykazali, że w osadzie bioaugmentowanym nastąpił całkowity rozkład obu tych związków, pomimo wzrostu obciążenia ścieków ładunkiem fenolu oraz chinoliny, odpowiednio z 100,2 do 153,2 mg/l oraz z 108,1 do 216,5 mg/l. W tym samym czasie w osadzie nieinokulowanym mineralizacji uległo 73–85% chinoliny oraz 82–95% fenolu. Dodatkowo obecność inokulanta w osadzie przyczyniła się do zwiększenia efektywności usuwania całkowitego węgla organicznego (CWO) ze ścieków i wpłynęła istotnie na wzrost bioróżnorodności mikroorganizmów. Chen i wsp. [8] po wprowadzeniu do reaktora SBR, obciążonego ściekami z papierni, szczepu *Gordonia* sp. JW8 zaobserwowali wzrost szybkości usuwania ChZT o 5% w stosunku do warunków kontrolnych. Podobnie Wang i wsp. [72] wykazali, że bioaugmentacja KOC, obciążonego ściekami z przemysłu tytoniowego, szczepem *Pseudomonas* sp. HF-1 przyczyniła się do uzyskania całkowitego rozkładu obecnej w ściekach nikotyny oraz prowadziła do wzrostu usunięcia ChZT z 84% do 91% w ciągu czterech kolejnych cykli pracy reaktora. Dla porównania wartość tego parametru w osadzie nieinokulowanym spadła w tym czasie z 90% do 65%.

Wzmocniona produkcja przemysłowa przyczynia się także do gwałtownego wzrostu zanieczyszczenia

ścieków WWA. Xu i wsp. [77] przeprowadzili skuteczną bioaugmentację KOC szczepem *Streptomyces* sp. QWE-35, zdolnym do rozkładu naftalenu. W ciągu 10 dni uzyskali o 36% wyższą redukcję wyjściowego stężenia tego związku w porównaniu do jego rozkładu w osadzie kontrolnym.

W wyniku stosowania w procesie oczyszczania ścieków środków flokulujących, w osadzie czynnym mogą pojawiać się syntetyczne, odporne na rozkład mikrobiologiczny polimery, jak np. poliakrylamid (PAM). Wen i wsp. [74] wykazali, że wprowadzenie do KOC skażonego PAM (100 mg/l) szczepu *Bacillus cereus* HWBI, zdolnego do rozkładu tego polimeru, zwiększyło stopień jego eliminacji, odpowiednio o 30 i 70% w reaktorze SBR i kontaktowym reaktorze oksydacyjnym (COR).

Z przeglądu literatury wynika, że bioaugmentacja TGOC jest również skuteczna w usuwaniu toksycznych zanieczyszczeń ze ścieków. Duque i wsp. [12] wykazali na przykład, że inokulacja TGOC w reaktorze SBR szczepem *Rhodococcus* sp. FP1, zdolnym do rozkładu 2-fluorofenolu (2-FF), skutkowała eliminacją FF ze ścieków w stężeniu 9–19 mg/l. Natomiast TGOC niepoddany bioaugmentacji nie był zdolny do mineralizacji FF. Na podstawie analiz genetycznych stwierdzono ponadto, że inokulowany szczep FP1 obecny był w granulach osadu w czasie 444 dni pracy reaktora. W innych badaniach Quan i wsp. [60] udowodnili, że bioaugmentacja TGOC szczepem *Achromobacter* sp. QXH, zdolnym do rozkładu kwasu 2,4-fenoksyoctowego, zwiększyła wydajność usuwania tego związku ze ścieków w stężeniu 144 i 565 mg/l, odpowiednio o 36% i 62% w porównaniu do osadu kontrolnego. Jednocześnie potwierdzono obecność szczepu w granulach osadu przez 200 dni trwania eksperymentu w liczebności komórek zbliżonej do liczebności wyjściowej (10^5 – 10^6 komórek/ml osadu).

3.2. Pojedyncze szczepy grzybów mikroskopowych

Mniej powszechne użycie grzybów niż bakterii do bioaugmentacji osadu czynnego wynika z ich wolniejszego wzrostu oraz wypierania z tego środowiska w wyniku współzawodnictwa z innymi organizmami [23]. Znane są jednak gatunki grzybów o potencjalnym znaczeniu w bioremediacji środowisk skażonych toksycznymi związkami, co wynika z obecności w ich komórkach lub wydzielanych zewnątrzkomórkowo kompleksów enzymatycznych o niskiej specyficzności substratowej i silnych właściwościach utleniających [24, 25] (Tabela II). Ponadto w ścianie komórkowej grzybów występują grupy funkcyjne (np. karboksylowa, hydroksylowa, aminowa, sulfonowa i fosfonianowa) wiążące toksyczne zanieczyszczenia. Badania Kumar'a i wsp. [33] oraz Kumar'a i Min [34] wskazują na zdol-

Tabela II
Wybrane grzyby mikroskopowe w bioaugmentacji konwencjonalnego osadu czynnego

Grzyby mikroskopowe	Rodzaj ścieków, związek toksyczny (mg/l)	Skala procesu/miejsce	Źródło
<i>Magnusiomyces ingens</i> LH-F1	ścieki syntetyczne, barwnik Acid Red B, 10–100	skala laboratoryjna, Chiny	[26]
<i>Candida tropicalis</i> TL-F1	ścieki syntetyczne, barwnik Acid Red B, 10–50	skala laboratoryjna, Chiny	[35]
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	surowe ścieki koksownicze, fenol, 1800	skala laboratoryjna, Chiny	[24]
<i>Phanerochaete</i> sp. HSD (chlamydospory)	ścieki syntetyczne, fenol, 400–2200	skala laboratoryjna, Chiny	[23]
<i>Trametes versicolor</i>	ścieki syntetyczne, farmaceutyki (ibuprofen, naproksen, ketoprofen, diklofenak, kwas salicylowy, metronidazol), pestycydy (pentachlorofenol, atrazyna), 4-tert-butylofenol, 4-tert-oktylofenol, bisfenol A, 0,005	skala laboratoryjna, Chiny	[51]
<i>Phanerochaete</i> sp. HSD	ścieki syntetyczne, czerni eriochromowa T, 50–400	skala laboratoryjna, Chiny	[22]
<i>Coriolus versicolor</i>	ścieki syntetyczne, atrazyna + aldikarb + alachlor, 10	skala laboratoryjna, Japonia	[20]
<i>Hansenula polymorpha</i>	surowe ścieki z przemysłu chemicznego, formaldehyd, 488 i 1128	skala laboratoryjna, Polska	[31]

ność grzybów *Trametes versicolor* oraz *Schizophyllum commune* do sorpcji fenolu oraz *o*- i *p*-chlorofenolu.

Bioaugmentacja osadu czynnego z udziałem grzybów przeprowadzana jest najczęściej w celu zwiększenia efektywności oczyszczania ścieków zawierających wysokie stężenia leków, związków fenolowych oraz barwników. Potwierdzają to badania Dhoubi'a i wsp. [11], którzy wykazali, że inokulacja KOC w skali laboratoryjnej grzybem *T. versicolor*, wydzielającym takie enzymy jak lakaza, peroksydaza manganowa oraz ligninowa, spowodowała wzrost wydajności transformacji hydroksytyrozolu oraz tyrozolu, odpowiednio z 40% do 75% oraz z 31% do 55%. Z kolei Hailei i wsp. [23] wykazali, że bioaugmentacja KOC, wysoko obciążonego ściekami fenolowymi, szczepem *Phanerochaete chrysosporium* przyczyniła się nie tylko do wzrostu szybkości rozkładu fenolu z 840 mg/g lotnych substancji stałych (VSS) na dobę do 1450 mg/g VSS na dobę, ale także do utrzymania stabilności procesu oczyszczania ścieków o stężeniu fenolu 1800 mg/l w porównaniu z osadem nieinokulowanym, zdolnym do rozkładu tego związku w stężeniu nieprzekraczającym 1200 mg/l. Skuteczną bioaugmentację KOC, obciążonego ściekami skażonymi barwnikiem Acid Red B (ARB), szczepem *Candida tropicalis* TL-F1 przeprowadzili także Li i wsp. [35]. Efektem tego zabiegu było skrócenie czasu rozkładu barwnika w stężeniu 25 oraz 50 mg/l, odpowiednio z 3 do 2 oraz z 6 do 3 dni. Jednocześnie zaobserwowano, że wprowadzenie tego grzyba do osadu przyczyniło się do obniżenia toksycznego działania barwnika na mikroorganizmy autochtoniczne.

3.3. Konsorcja mikroorganizmów

Pomimo, że wprowadzanie do środowiska osadu czynnego wyspecjalizowanych, pojedynczych szczepów bakterii i grzybów często przynosi pożądane efekty [46, 75–77], bioaugmentacja z użyciem mieszanych konsor-

cjów mikroorganizmów wydaje się stanowić bardziej skuteczną strategię w usuwaniu toksycznych zanieczyszczeń ze ścieków (Tabela III). Mieszane konsorcja mikroorganizmów zazwyczaj są zdolne do rozkładu wielu związków jednocześnie, co wynika z uzupełniania się ich zdolności degradacyjnych, a także może być wynikiem mniejszej wrażliwości na zmiany czynników środowiskowych niż pojedynczych szczepów [57]. Quan i wsp. [59] bioaugmentowali w warunkach laboratoryjnych KOC, obciążony 2,4-dichlorofenolem (2,4-DCP) (50 mg/l), konsorcjum bakteryjnym o składzie: *Achromobacter* sp. i *Flavobacterium breve*, zdolnym do rozkładu fenolu i jego pochodnych. Wykazali, że bakterie wprowadzone jednocześnie do reaktora przepływowego z całkowitym wymieszaniem (CSTR) odznaczały się lepszą zdolnością do tworzenia kłaczków i inkorporacji w strukturę osadu czynnego niż inokulowane pojedynczo szczepy. Stwierdzili także, że tempo rozkładu 2,4-DCP zależało od liczebności bakterii w inokulacji. Największą wydajność rozkładu 2,4-DCP (88–99% w ciągu 30 dni) uzyskali, gdy introdukowane konsorcjum bakterii stanowiło 15% objętości reaktora. Dla porównania w osadzie niebioaugmentowanym oraz bioaugmentowanym pojedynczymi szczepami efektywność rozkładu 2,4-DCP wynosiła odpowiednio 46–61% i 78–89%. Niestety wynikiem jednorazowej inokulacji mieszaniny mikroorganizmów do reaktora CSTR było ich stopniowe zamieranie i utrata aktywności degradacyjnej w 100 dniu eksperymentu. W innych badaniach Jiang i wsp. [29] do KOC, zanieczyszczonego syntetycznymi ściekami obciążonymi ładunkiem fenolu (1500 mg/l na dobę), introdukowali 2-składnikowe konsorcjum bakteryjne złożone ze szczepu *Propionifera* PG-02 zdolnego do rozkładu fenolu oraz szczepu *Comamonas* sp. PG-08 o słabym potencjale degradacji tego związku. Stwierdzili, że wprowadzenie do osadu mieszanej kultury tych mikroorganizmów znacząco poprawiło efektywność usuwania fenolu ze

Tabela III
Konsorcja mikroorganizmów w bioaugmentacji osadu czynnego

Konsorcjum mikroorganizmów	Rodzaj ścieków, związek toksyczny (mg/l)	Skala procesu / miejsce / rodzaj osadu	Źródło
<i>Bacillus thuringiensis</i> B-4-9, <i>B. cereus</i> BS-3-12 i <i>Acidovorax ebreus</i> JF-3	surowe ścieki rafineryjne: woda (v/v; 1:18; 1:12,5)	skala laboratoryjna, Chiny; KOC	[71]
	surowe ścieki rafineryjne: woda (v/v; 1:18)	pilotażowa oczyszczalnia ścieków, Chiny; KOC	
Bakterie z rodzajów <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Flavobacterium</i> i <i>Micrococcus</i>	ścieki petrochemiczne	skala techniczna, oczyszczalnia ścieków, Chiny; KOC	[40]
<i>Rhodococcus</i> sp. YYL, <i>B. cereus</i> MLY1 i <i>B. aquimaris</i> MLY2	ścieki syntetyczne, tetrahydrofuran, 1442	skala laboratoryjna, Chiny, KOC	[78]
Konsorcjum BM-S-1	ścieki garbarskie	pilotażowa oczyszczalnia ścieków, Korea; KOC	[32]
<i>Pandoraea</i> sp. PG-01 i <i>Rhodococcus erythropolis</i> PG-03	ścieki syntetyczne, fenol, 500	skala laboratoryjna, Chiny; KOC	[29]
<i>Propionifera</i> PG-02 i <i>Comamonas</i> sp. PG-08	ścieki syntetyczne, fenol, 500	skala laboratoryjna, Chiny; TGOC	[30]
Konsorcjum nieoznaczonych szczepów, <i>Achromobacter</i> sp. i <i>Flavobacterium breve</i>	ścieki syntetyczne, 2,4-dichlorofenol, 50	skala laboratoryjna, Chiny; KOC	[59]
<i>Coriolus versicolor</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> i <i>Azotobacter</i> sp.	surowe ścieki z przemysłu papierniczego z dodatkiem ługu czarnego	skala laboratoryjna, Chiny, KOC	[81]
Konsorcjum <i>Cryptococcus humicolus</i> MCN2 i bakterii rozkładających cyjanki	ścieki syntetyczne, cyjanek potasu, 25–50	skala laboratoryjna, Korea; KOC	[55]
<i>Pandoraea</i> B-6, <i>Comamonas</i> B-9 i <i>Aspergillus</i> F-1	mieszanina syntetycznych i surowych ścieków z przemysłu papierniczego z dodatkiem ługu czarnego	skala laboratoryjna, Chiny; KOC	[21]

Objaśnienia: KOC – konwencjonalny osad czynny, TGOC – tlenowy granulowany osad czynny

ścieków w stosunku do eliminacji tego związku w osadzie bioaugmentowanym pojedynczymi szczepami. Ponadto wykazali kooperację pomiędzy badanymi drobnoustrojami, dzięki występującej między nimi silnej koagregacji (67–74%) oraz zdolności do komunikacji za pośrednictwem autoinduktorów. Całkowitą mineralizację fenolu w osadzie czynnym obserwowali po 2 dniach od momentu wprowadzenia konsorcjum bakteryjnego, podczas gdy inokulowanie do tego środowiska szczepu *Comamonas* sp. PG-08 indywidualnie wydłużało czas degradacji tego związku do 16 dni. Dla porównania osad bioaugmentowany z użyciem szczepu *Propionifera* PG-02 oraz osad niebioaugmentowany nie były zdolne do rozkładu fenolu, co skutkowało upośledzeniem procesu tworzenia kłaczków. Bioaugmentacja osadu konsorcjum bakteryjnym wspomagała natomiast proces tworzenia kłaczków już po 7 dniach od momentu inokulacji. Podobnie Yao i wsp. [78] stwierdzili istnienie kooperacji pomiędzy zdolnym do mineralizacji tetrahydrofuranu (THF) szczepem *Rhodococcus* sp. YYL, a nierozkładającymi tego związku szczepami *B. cereus* MLY1 i *Bacillus aquimaris* MLY2, użytymi do bioaugmentacji KOC obciążonego ściekami syntetycznymi zawierającymi THF (1442 mg/l). Wykazali, że bioaugmentacja osadu z użyciem mieszanej kultury mikroorganizmów okazała się bardziej efektywnym

rozwiązaniem w usuwaniu THF ze ścieków niż inokulacja pojedynczym szczepem *Rhodococcus* sp. YYL, który nie był w stanie kolonizować tego środowiska. Natomiast szczepy z rodzaju *Bacillus*, obdarzone cechami umożliwiającymi im przeżywanie w osadzie czynnym, wspomogły inkorporację bakterii *Rhodococcus* sp. YYL w strukturę kłaczków, co przyczyniło się do uzyskania praktycznie całkowitego rozkładu THF w ściekach w ciągu 20 dni. W innych badaniach Chattaraj i wsp. [7] wykorzystali mieszane konsorcjum bakteryjne VN11, obejmujące szczepy: *Providencia* sp. VN11A, *Brevibacillus* sp. VN11B, *Alcaligenes* sp. VN11C i *Pseudomonas* sp. VN11D do bioaugmentacji KOC, obciążonego typowymi ściekami doprowadzanymi do oczyszczalni ścieków. Wykazali, że wprowadzenie do osadu badanych mikroorganizmów umożliwiło skuteczne usuwanie różnego rodzaju zanieczyszczeń w warunkach tlenowych oraz w warunkach anoksji, w temperaturze 37°C oraz pH 7,0. Inokulacja osadu czynnego konsorcjum bakteryjnym przyczyniła się do eliminacji substancji stałych, związków fosforu, azotu i siarki oraz fenoli na poziomie, odpowiednio 82, 80, 86, 81 i 89%.

Dane literaturowe wskazują, że nie zawsze zastosowanie do bioaugmentacji osadu czynnego podobnych do siebie pod względem funkcjonalnym grup mikroorganizmów odnosi oczekiwany skutek. Park i wsp. [55]

nie obserwowali pozytywnego wpływu bioaugmentacji KOC mieszanym konsorcjum drożdży *Cryptococcus humicolus* MCN2 oraz niezidentyfikowanych mikroorganizmów na rozkład cyjanku potasu (KCN) (25–50 mg/l) w ściekach syntetycznych. Stwierdzili natomiast znaczne pogorszenie właściwości osadu czynnego w wyniku jego narażenia na toksyczne działanie KCN. Z kolei Jiang i wsp. [30] wykazali, że jednoczesne wprowadzenie do KOC, skażonego syntetycznymi ściekami obciążonymi ładunkiem fenolu (1500 mg/l na dobę), szczepów *Pandoraea* sp. PG-01 i *Rhodococcus erythropolis* PG-03 prowadziło do kompetycji między tymi mikroorganizmami. Wynikiem tego zjawiska była dominacja bakterii Gram-ujemnej, odznaczającej się szybszym wzrostem w obecności hydroksybenzeny niż bakterii Gram-dodatniej. Stwierdzili ponadto, że inokulowane pojedynczo do osadu szczepy były zdolne do przeżywania w tym środowisku, pomimo braku zdolności do agregacji, tworzenia biofilmu oraz produkcji bioflokulantów.

3.4. Mikroorganizmy modyfikowane genetycznie

Wprowadzenie do osadu czynnego mikroorganizmów modyfikowanych genetycznie, będących donorami genów katabolicznych zlokalizowanych w plazmidach lub innych ruchomych elementach genetycznych, takich jak transpozony czy wyspy genomowe, stanowi alternatywę dla klasycznej bioaugmentacji (Tabela IV). Strategia ta nie jest jednak powszechnie stosowana w systemach biologicznego oczyszczania ścieków ze względu na obawy związane z horyzontalnym transferem genów [68]. Ponadto zmodyfikowane szczepy bakterii o wysokiej aktywności degradacyjnej po introdukcji do osadu czynnego często trudno adaptują się do

warunków panujących w tym środowisku, tracą zdolności rozkładu lub transformacji toksycznych zanieczyszczeń i w konsekwencji zamierają.

Jin i wsp. [28] w swoich badaniach oceniali wpływ inokulacji KOC genetycznie modyfikowanym szczepem *Escherichia coli* JM109 (pGEX-AZR), będącym gospodarzem plazmidu zawierającego gen kodujący enzym azoreduktazę, na wydajność dekoloryzacji barwnika C.I. Direct Blue 71 (DB71) przy różnych wartościach pH. Największą wydajność dekoloryzacji DB71 w stężeniu 150 mg/l (89%) autorzy uzyskali w ciągu 12 godzin w osadzie bioaugmentowanym o pH 9, natomiast w bioaugmentowanym osadzie o pH 5 wydajność dekoloryzacji wyniosła w tym samym czasie 67%. Ponieważ w osadzie nieinokulowanym o pH 5 redukcja barwnika kształtowała się na zbliżonym poziomie (70%) jak w osadzie inokulowanym o pH 9, stwierdzono, że bioaugmentacja osadu szczepem *E. coli* JM109 (pGEX-AZR) była szczególnie efektywna przy oczyszczaniu ścieków obciążonych DB71 o silnie zasadowym pH. W innych badaniach Quan i wsp. [61] inokulowali TGOC szczepem *P. putida* SM1443, gospodarzem plazmidu pJP4, zawierającym między innymi geny kodujące enzymy dioksygenazę kwasu 2,4-D-dichlorofenoksyoctowego / α -oksooglutarynowego i monooksygenazę 2,4-dichlorofenolową, zaangażowane w procesy transformacji kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D). Wykazali, że w osadzie bioaugmentowanym 2,4-D (160 mg/l) uległ całkowitej degradacji w ciągu 62 godzin, natomiast w osadzie niebioaugmentowanym w tym czasie biodegradacji uległo około 26% wyjściowej dawki tego związku.

Ważną zaletą ruchomych elementów genetycznych u bakterii jest zdolność przenoszenia informacji genetycznej o syntezie enzymów katabolicznych między

Tabela IV
Genetycznie modyfikowane mikroorganizmy w bioaugmentacji osadu czynnego w skali laboratoryjnej

Mikroorganizm	Wektory/geny kataboliczne	Związek, mg/l / Rodzaj osadu	Źródło
<i>Rhodococcus</i> sp. p52	plazmidy pDF01 i pDF02 (geny kodujące dioksygenazę)	dibenzofuran, 300; KOC	[71]
<i>Pseudomonas putida</i> SM1443	plazmid pJP4 (geny kodujące m.in. dioksygenazę kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego/ α -oksooglutarynowego i monooksygenazę 2,4-dichlorofenolową)	kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy, 400; 4-chlorofenol, 5–45; 2,4-dichlorofenol, 25–45; 2,4,6-trichlorofenol, 5–20; TGOC	[41, 61]
<i>Pseudomonas putida</i> SM1443		kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy, 8–385; TGOC	[61]
<i>Escherichia coli</i> JM109 (pGEX-AZR)	wektor pGEX4T-1 (gen kodujący azoreduktazę)	Direct Blue 71, 150–550; KOC	[28]
<i>Comamonas testosteroni</i> SB3	plazmid pNB2::dsRed (gen kodujący dioksygenazę)	3-chloroanilina, 8–100; KOC	[4]
<i>Pseudomonas putida</i> KT2442	plazmid pWWO (geny kodujące oksygenazę toluenową oraz enzymy szlaku meta)	alkohol benzyłowy, 540; TGOC	[49]

Objaśnienia: KOC – konwencjonalny osad czynny, TGOC – tlenowy granulowany osad czynny

komórkami nawet odległych filogenetycznie gatunków bakterii. Bathe i wsp. [4] oceniali efekt bioaugmentacji KOC, skażonego ściekami zawierającymi 3-chloroanilinę (3-CA) w zakresie stężeń 100–400 mg/l, szczepem *C. testosteroni* SB3, gospodarzem plazmidu pNB2::dsRed, niosącego geny kodujące enzymy zaangażowane w rozkład 3-CA. Stwierdzili, że szczep ten słabo przeżywał w osadzie i w 62 dniu eksperymentu stanowił zaledwie 1% całkowitej populacji mikroorganizmów. Jednocześnie potwierdzili wzrost liczby kopii plazmidu pNB2::dsRed w środowisku osadu, co wskazywało na transfer oraz ekspresję genów odpowiedzialnych za rozkład tego związku w komórkach mikroorganizmów autochtonicznych, mimo słabej przeżywalności dawcy. Nie mniej jednak wprowadzenie badanego szczepu do KOC korespondowało z całkowitym rozkładem 3-CA w ciągu 40 dni.

W innych badaniach Sun i wsp. [71] oceniali efektywność transferu genów katabolicznych zlokalizowanych w plazmidach pDF01 i pDF02 z komórek *Rhodococcus* sp. p52 inokulowanych do KOC do mikroorganizmów autochtonicznych na rozkład dibenzofuranu (DBF) (300 mg/l). Stwierdzili, że w bioaugmentowanym osadzie całkowity rozkład DBF nastąpił w czasie 60 dni, podczas gdy w osadzie nieinokulowanym biodegradacja tego związku nie zachodziła.

3.5. Biopreparaty handlowe

Stosowane na potrzeby bioaugmentacji komercyjne biopreparaty, zawierające zdefiniowane konsorcja mikroorganizmów, wykazują wiele zalet z uwagi na ich aspekty praktyczne. Stosowanie ich eliminuje przede wszystkim konieczność izolowania oraz odpowiedniego przygotowywania drobnoustrojów. Ponadto są one łatwe w magazynowaniu i dozowaniu. Biopreparaty dostępne są najczęściej w postaci roztworów oraz liofilizatów, co zapewnia utrzymanie stałego stężenia mikroorganizmów dostarczanych do reaktora biologicznego. Poza wyselekcjonowanymi mikroorganizmami w ich skład mogą wchodzić także enzymy, mikro- i makroelementy, surfaktanty, związki regulujące pH i stymulujące wzrost bakterii oraz składniki wiążące odory. Pewną niedogodnością z naukowego punktu widzenia w stosowaniu tych produktów jest brak znajomości ich szczegółowego składu mikrobiologicznego i chemicznego z uwagi na ochronę patentową. Ponadto z wielu prac wynika, że mikroorganizmy w takich preparatach mogą utracić swoją aktywność lub zdolności do wzrostu na skutek liofilizacji lub nieodpowiedniego przechowywania [2]. Z badań Miyamoto-Shinohara i wsp. [43] wynika na przykład, że proces liofilizacji oraz przechowywanie liofilizatów w niskich temperaturach i w warunkach próżni miały istotny wpływ na przeżywalność różnych grup mikroorganizmów. Najbardziej

wrażliwe na działanie tej procedury były drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, których przeżywalność po liofilizacji spadła do 10% i utrzymywała się na tym poziomie w ciągu 10 lat przechowywania w warunkach próżni. Dla odmiany śmiertelność bakterii Gram-ujemnych oraz Gram-dodatnich po liofilizacji wynosiła, odpowiednio 50 i 80% i wyraźnie się zmniejszała w wyniku dalszego przechowywania (do 5% w ciągu 5 lat).

Obecnie spośród wielu dostępnych na rynku biopreparatów tylko niektóre znajdują zastosowanie do wspomagania rozkładu toksycznych zanieczyszczeń obecnych w ściekach. Należą do nich między innymi preparaty Phenol-Bac i In-balance firmy Lucerne biotech, stosowane do usuwania ze ścieków fenolu i jego pochodnych, benzenu i alkoholi. Natomiast przeważająca większość preparatów używana jest do poprawy struktury kłaczków i właściwości flokulacyjnych osadu czynnego, intensyfikacji procesu nitrifikacji, redukcji pienienia, odorów i osadu nadmiernego.

4. Podsumowanie

Z dokonanego przeglądu literatury wynika, że bioaugmentacja KOC i TGOC jest obiecującą metodą w zwiększaniu wydajności usuwania szkodliwych zanieczyszczeń ze ścieków. O jej skuteczności decyduje przede wszystkim dobór mikroorganizmów do inokulacji o pożądanych zdolnościach degradacji konkretnych związków, wbudowywania się w strukturę kłaczków i granul oraz synergicznym typie oddziaływań z mikroflorą autochtoniczną. Efekt bioaugmentacji mogą także wspomagać dodatkowe zabiegi poprzedzające inokulację, jak adaptacja wybranych szczepów do rozkładu toksycznych związków, głodzenie, biostymulacja czyli dostarczenie mikroorganizmom dodatkowych źródeł węgla, azotu i fosforu, biosurfaktantów, substancji mineralnych oraz immobilizacja komórek na różnych nośnikach. Duże nadzieje wiąże się także z zastosowaniem nowoczesnych technik molekularnych do monitorowania liczebności i aktywności inokulantów w osadzie. Ze względu na to, że większość prowadzonych badań nad bioaugmentacją osadu ogranicza się do skali laboratoryjnej i wiedza w zakresie interakcji między introdukowanymi szczepami a zespołami mikroorganizmów autochtonicznych jest wciąż ograniczona, konieczne jest przeprowadzanie testów w skali technicznej, odzwierciedlającej rzeczywiste warunki eliminacji zanieczyszczeń oraz poszukiwanie skutecznych narzędzi do monitorowania losów inokulantów w tym ekosystemie.

Podziękowania

Artykuł powstał w wyniku realizacji projektu nr 2016/23/N/NZ9/00158 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

Piśmiennictwo

- Almaguer-Cantú V., Morales-Ramos L.H., Balderas-Rentería I.: Biosorption of lead (II) and cadmium (II) using *Escherichia coli* genetically engineered with mice metallothionein I. *Water Sci. Technol.* **63**, 1607–1613 (2011)
- Augustynowicz J., Kaszycki P., Kuś M., Białecka A., Koloczek H.: Optimized methods for stabilization of microbial communities specializing in biodegradation of organic environmental contaminants. *Pol. J. Environ. Stud.* **17**, 655–664 (2008)
- Barr J.J., Slater F.R., Fukushima T., Bond P.L.: Evidence for bacteriophage activity causing community and performance changes in a phosphorus-removal activated sludge. *FEMS Microbiol. Ecol.* **74**, 631–642 (2010)
- Bathe S., Schwarzenbeck N., Hausner M.: Bioaugmentation of activated sludge towards 3-chloroaniline removal with a mixed bacterial population carrying a degradative plasmid. *Bioresour. Technol.* **100**, 2902–2909 (2009)
- Cai B., Xie L., Yang D., Arcangeli J.P.: Toxicity evaluation and prediction of toxic chemicals on activated sludge system. *J. Hazard. Mater.* **177**, 414–419 (2010)
- Chasib K.F.: Extraction of phenolic pollutants (phenol and *p*-chlorophenol) from industrial wastewater. *J. Chem. Eng. Data*, **58**, 1549–1564 (2013)
- Chataraj S., Purohit H.J., Sharma A., Jadeja N.B., Madamwar D.: Treatment of common effluent treatment plant wastewater in a sequential anoxic-oxic batch reactor by developed bacterial consortium VN11. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **179**, 514–529 (2016)
- Chen J., Zhan P., Koopman B., Fang G., Shi Y.: Bioaugmentation with *Gordonia* strain JW8 in treatment of pulp and paper wastewater. *Clean Technol. Environ.* **14**, 899–904 (2012)
- Chen G., Zhu N., Tang Z., Ye P., Hu Z., Liu L.: Resource availability shapes microbial motility and mediates early-stage formation of microbial clusters in biological wastewater treatment processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 1459–1467 (2014)
- Cirja M., Hommes G., Ivashechkin P., Prell J., Schäffer A., Corvini F.X., Lenz M.: Impact of bio-augmentation with *Sphingomonas* sp. strain TTNP3 in membrane bioreactors degrading nonylphenol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**, 193–189 (2009)
- Dhouib A., Ellouz M., Aloui F., Sayadi S.: Effect of bioaugmentation of activated sludge with white-rot fungi on olive mill wastewater detoxification. *Lett. Appl. Microbiol.* **42**, 405–411 (2006)
- Duque A.F., Bessa V.S., Castro M.L.: Characterization of the bacterial communities of aerobic granules in a 2-fluorophenol degrading process. *Biotechnol. Rep.* **5**, 98–104 (2015)
- Fatone F., Di Fabio S., Bolzonella D., Cecchi E.: Fate of aromatic hydrocarbons in Italian municipal wastewater systems: an overview of wastewater treatment using conventional activated-sludge processes (CASP) and membrane bioreactors (MBRs). *Water Res.* **45**, 93–104 (2011)
- Fu W., Fu H., Skott K., Yang M.: Modeling the spill in the Songhua River after the explosion in the petrochemical plant in Jilin. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **15**, 178–181 (2008)
- Gromiec M.J.: NEREDA – innowacyjna technologia granulowanego osadu czynnego do oczyszczania ścieków przemysłowych i komunalnych. *Gaz, Woda i Technika Sanitarna*, **5**, 179–183 (2011)
- Guo J., Wang J., Cui D., Wang L., Ma F., Chang C.-C., Yang J.: Application of bioaugmentation in the rapid start-up and stable operation of biological processes for municipal wastewater treatment at low temperatures. *Bioresour. Technol.* **110**, 6622–6629 (2010)
- Guo J., Peng Y., Huang H., Wang S., Ge S., Zhang J., Wang Z.: Short- and long-term effects of temperature on partial nitrification in a sequencing batch reactor treating domestic wastewater. *J. Hazard. Mater.* **179**, 471–479 (2010)
- Guo J.Y., Yu J.: Sorption characteristics and mechanisms of Pb(II) from aqueous solution by using bioflocculant MBFR10543. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 6431–6441 (2014)
- Gupta A., Thakur I.S.: Study of optimization of wastewater contaminant removal along with extracellular polymeric substances (EPS) production by a thermotolerant *Bacillus* sp. ISTVK1 isolated from heat shocked sewage sludge. *Bioresour. Technol.* **213**, 21–30 (2016)
- Hai F., Modin O., Yamamoto K., Nghiem L.D.: Pesticide removal by a mixed culture of bacteria and white rot fungi. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **43**, 459–462 (2012)
- Hailei W., Ping L., Feng P.: The effect of bioaugmentation on the performance of sequencing batch reactor and sludge characteristics in the treatment process of papermaking wastewater. *Bioproc. Biosyst. Eng.* **29**, 283–289 (2006)
- Hailei W., Ping L., Guosheng L., Xin L., Jianming Y.: Rapid biodecolorization of eriochrome black T wastewater by bioaugmented aerobic granules cultivated through a specific method. *Enzyme Microb. Tech.* **47**, 37–43 (2010)
- Hailei W., Li L., Ping L., Hui L., Guosheng L., Jianming Y.: The acceleration of sludge granulation using the chlamydo spores of *Phanerochaete* sp. HSD. *J. Hazard. Mater.* **192**, 963–969 (2011)
- Hailei W., Ping L., Ling W., Lei L., Jianming Y.: Metagenomic insight into the bioaugmentation mechanism of *Phanerochaete chrysosporium* in an activated sludge system treating coking wastewater. *J. Hazard. Mater.* **321**, 820–829 (2017)
- Harms H., Schlosser D., Wick L. W.: Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 177–192 (2011)
- He M., Tan L., Ning S., Song L., Shi S.: Performance of the biological aerated filter bioaugmented by a yeast *Magnusiomyces ingens* LH-F1 for treatment of Acid Red B and microbial community dynamics. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 39 (2017)
- Ikeda-Ohtsubo W., Miyahara M., Kim S.-W., Yamada T., Matsuoka M., Watanabe A., Fushinobu S., Wakagi T., Shoun H., Miyauchi K., Endo G.: Bioaugmentation of a wastewater bioreactor system with the nitrous oxide-reducing denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain TR2. *J. Biosci. Bioeng.* **15**, 37–42 (2013)
- Jin R., Yang H., Zhang A., Wang J., Liu G.: Bioaugmentation on decolorization of C.I. Direct Blue 71 by using genetically engineered strain *Escherichia coli* JM109 (pGEX-AZR). *J. Hazard. Mater.* **163**, 1123–1128 (2009)
- Jiang H.-L., Tay J.-H., Maszenian A.M., Tay S.T.-L.: Enhanced phenol biodegradation and aerobic granulation by two coaggregating bacterial strains. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 6137–6142 (2006)
- Jiang H.-L., Maszenian A. M., Tay J.-H.: Bioaugmentation and coexistence of two functionally similar bacterial strains in aerobic granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**, 1191–1200 (2007)
- Kaszycki P., Koloczek H.: Biodegradation of formaldehyde and its derivatives in industrial wastewater with methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* and with the yeast-bioaugmented activated sludge. *Biodegradation*, **13**, 91–99 (2002)
- Kim I.-S., Ekpeghere K., Ha S.-Y., Kim S.-H., Kim B.-S., Song B., Chun J., Chang J.-S., Kim H.-G., Koh S.-C.: An eco-friendly treatment of tannery wastewater using bioaugmentation with a novel microbial consortium. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* **48**, 1732–1739 (2013)
- Kumar N.S., Boddu V.M., Krishnaiah A.: Biosorption of phenolic compounds by *Trametes versicolor* polyporus fungus. *Adsorp. Sci. Technol.* **21**, 31–46 (2009)
- Kumar N.S., Min K.: Phenolic compounds biosorption onto *Schizophyllum commune* fungus: FTIR analysis, kinetics and adsorption isotherms modeling. *Chem. Eng. J.* **168**, 562–571 (2011)

35. Li H., Tan L., Ning S., He M.: Reactor performance and microbial community dynamics during aerobic degradation and detoxification of Acid Red B with activated sludge bioaugmented by a yeast *Candida tropicalis* TL-F1 in MBR. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **104**, 149–156 (2015)
36. Liu X.W., Sheng G.P., Yu H.Q.: Physicochemical characteristics of microbial granules. *Biotechnol. Adv.* **27**, 1061–1070 (2009)
37. Liu X., Chen Y., Zhang X., Wang L.: Aerobic granulation strategy for bioaugmentation of a sequencing batch reactor (SBR) treating high strength pyridine wastewater. *J. Hazard. Mater.* **15**, 153–160 (2015)
38. Liu J., Yu Y., Chang Y., Li B., Bian D., Yang W., Huo H., Huo M., Zhu S.: Enhancing quinoline and phenol removal by adding *Comamonas testosteroni* bdq06 in treatment of an accidental dye wastewater. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **115**, 74–82 (2016)
39. Lourenço N.D., Franca R.D.G., Moreira M.A., Gil F.N., Viegas C.A., Pinheiro H.M.: Comparing aerobic granular sludge and flocculent sequencing batch reactor technologies for textile wastewater treatment. *Biochem. Eng. J.* **104**, 57–63 (2015)
40. Ma F., Guo J.-B., Zhao L.-J., Cahng C.-C., Cui D.: Application of bioaugmentation to improve the activated sludge system into the contact oxidation system treating petrochemical wastewater. *Bioresour. Technol.* **100**, 597–602 (2009)
41. Ma J.-Y., Quan X.-C., Yang Z.-F., Li A.-J.: Biodegradation of a mixture of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and multiple chlorophenols by aerobic granules cultivated through plasmid pJP4 mediated bioaugmentation. *Chem. Eng. J.* **181–182**, 144–151 (2012)
42. Martín-Hernández M., Suárez-Ojeda M.E., Carrera J.: Bioaugmentation for treating transient or continuous *p*-nitrophenol shock loads in an aerobic sequencing batch reactor. *Bioresour. Technol.* **123**, 150–156 (2012)
43. Miyamoto-Shinohara Y., Imaizumi T., Sukenobe J., Murakami Y., Kawamura S., Komatsu Y.: Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. *Cryobiology*, **3**, 251–255 (2000)
44. Miège C., Choubert J.M., Ribeiro L., Eusèbe M., Coquery M.: Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants—conception of a database and first results. *Environ. Pollut.* **157**, 1721–1726 (2008)
45. Morling S., Åstrand N., Lindar A.N.: Biological removal of nitrogen compounds at a coke-oven effluent stream. *J. Water Res. Prot.* **4**, 400–406 (2012)
46. Monsalvo V.M., Tobajas M., Mohedano A. F., Rodriguez J.J.: Intensification of sequencing batch reactors by cometabolism and bioaugmentation with *Pseudomonas putida* for the biodegradation of 4-chlorophenol. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **87**, 1270–1275 (2012)
47. More T.T., Yadav J.S.S., Yan S., Tyagi R.D., Surampalli R.Y.: Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. *J. Environ. Manage.* **144**, 1–25 (2014)
48. Mroziak A., Piotrowska-Seget Z.: Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiol. Res.* **165**, 363–375 (2010)
49. Nancharaiah Y.V., Joshi H.M., Hausner M., Venugopalan V.P.: Bioaugmentation of aerobic microbial granules with *Pseudomonas putida* carrying TOL plasmid. *Chemosphere*, **71**, 30–35 (2008)
50. Nancharaiah Y.V., Reddy G.K.K. Aerobic granular sludge technology: mechanisms of granulation and biotechnological applications. *Bioresour. Technol.* DOI:10.1016/j.biortech.2017.09.13 (2017)
51. Nguyen L.N., Hai F.I., Yang S., Kang J., Leuch F.D.L., Roddick F., Price W.E., Nghiem L.D.: Removal of trace organic contaminants by an MBR comprising a mixed culture of bacteria and white-rot fungi. *Bioresour. Technol.* **148**, 234–241 (2013)
52. Nouha K.: EPS producing microorganisms from municipal wastewater activated sludge. *J. Pet. Environ. Biotechnol.* **7**, 1–13 (2015)
53. Nwanyanwu C., Alisi C.S., Newke C.O., Chibuogwu O.: Cell surface properties of phenol-utilizing bacteria isolated from petroleum refinery wastewater. *J. Res. Biol.* **2**, 383–391 (2012)
54. Nzila A., Razzak S.A., Zhu J.: Bioaugmentation: an emerging strategy of industrial wastewater treatment for reuse and discharge. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **13**, 1–20 (2016)
55. Park D., Lee D.S., Kim Y.M., Park J.M.: Bioaugmentation of cyanide-degrading microorganisms in a full-scale cokes wastewater treatment facility. *Bioresour. Technol.* **99**, 2092–2096 (2008)
56. Podedworna J., Piechna P.: Tlenowy granulowany osad czynny. Koncepcje mechanizmów formowania, właściwości i wymagania technologiczne. Seidel-Przywecki Sp z o.o., Józefosław, 2017.
57. Qu Y., Zhang X., Ma Q., Deng J., Deng Y., Van Nostrand J. D., Wu L., He Z., Qin Y., Zhou J., Zhou J.: Microbial community dynamics and activity link to indigo production from indole in bioaugmented activated sludge systems. *PLoS One*, **10**, 1–15 (2015)
58. Qu Y., Zhang R., Ma Q., Zhou J., Yn B.: Bioaugmentation with a novel alkali-tolerant *Pseudomonas* strain for alkaline phenol wastewater treatment in sequencing batch reactor. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 1919–1926 (2011)
59. Quan X., Schi H., Liu H., Lv P., Qian Y.: Enhancement of 2,4-dichlorophenol degradation in conventional activated sludge systems bioaugmented with mixed special culture. *Water Res.* **28**, 245–253 (2004)
60. Quan X., Ma J., Xiong W., Wang X.: Bioaugmentation of half-matured granular sludge with special microbial culture promoted establishment of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degrading aerobic granules. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **38**, 1081–1090 (2015)
61. Quan X.-C., Tang H., Xiong W.-C., Yang Z.-F.: Bioaugmentation of aerobic sludge granules with a plasmid donor strain for enhanced degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *J. Hazard. Mater.* **179**, 1136–1142 (2010)
62. Sarma S.J., Tay J.H.: Aerobic granulation for future wastewater treatment technology: challenges ahead. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* DOI:10.1039/c7ew00148g (2017)
63. Saunders A.M., Albertsen M., Vollertsen J., Nielsen P.H.: The activated sludge ecosystem contains a core community of abundant organisms. *ISME J.* **10**, 11–20 (2016)
64. Schneider I., Topalova Y.: Microbial structure and functions of biofilm during wastewater treatment in the dairy industry. *Biotechnol. Biotec. Eq.* **27**, 3782–3786 (2013)
65. Sheng G., Yu H., Li X.: Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. *Biotechnol. Adv.* **28** 882–894 (2010)
66. Singhal N., Perez-Garcia O.: Degrading organic micropollutants: the next challenge in the evolution of biological wastewater treatment processes. *Front. Environ. Sci.* **4**, 1–5 (2016)
67. Sipma J., Osuna M.B., Emanuelsson M.A.E., Castro P.M.: Biotreatment of industrial wastewaters under transient-state conditions: process stability with fluctuations of organic load, substrates, toxicants, and environmental parameters. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* **40**, 147–197 (2010)
68. Soda S., Otsuki H., Inoue., Tsutsui H., Sei K., Ike M.: Transfer of antibiotic multiresistant plasmid RP4 from *Escherichia coli* to activated sludge bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* **3**, 292–296 (2008)
69. Song Z., Ning T., Chen Y., Cheng X., Ren N.: Bioaugmentation of aerobic granular sludge with the addition of a biofloculant-producing consortium. *Adv. Mat. Res.* **726–731**, 2530–2535 (2013)

70. Sun S., Fang L., Song Z., Wang X., Wang J., Luo Y., Zhang Z., Zhang G., Jiang Q., Zhang Z.: Bioaugmentation for improving the activated sludge process of treating refinery spent caustic: laboratory and field pilot-scale studies. *Desalin. Water Treat.* **57**, 1–8 (2016)
71. Sun Y.Q., Ding P., Peng P., Yang H., Li L.: Conjugative transfer of dioxin-catabolic megaplasms and bioaugmentation prospects of a *Rhodococcus* sp. *Environ. Sci. Technol.* **51**, 6298–6307 (2017)
72. Wang M.Z., Yang G.Q., Min H., Lv Z.M., Jia X.Y.: Bioaugmentation with the nicotine-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. HF-1 in a sequencing batch reactor treating tobacco wastewater: degradation study and analysis of its mechanisms. *Water Res.* **43**, 4187–4196 (2009)
73. Wang J., He H., Wang M., Wang S., Zhang J., Wei W., Xu H., Lv Z., Shen D.: Bioaugmentation of activated sludge with *Acinetobacter* sp. TW enhances nicotine degradation in a synthetic tobacco wastewater treatment system. *Bioresour. Technol.* **142**, 445–453 (2013)
74. Wen Q.X., Zhang H.C., Chen Z.Q., Zhao Y., Feng Y.J.: Bioaugmentation for polyacrylamide degradation in a sequencing batch reactor and contact oxidation reactor. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* **47**, 358–365 (2012)
75. Wen D., Zhang J., Xiong R., Liu R., Chen L.: Bioaugmentation with a pyridine-degrading bacterium in a membrane bioreactor treating pharmaceutical wastewater. *J. Environ. Sci.* **25**, 2265–2271 (2013)
76. Xenofontos E., Tanase A-M., Stoica I., Vyrides I.: Newly isolated alkalophilic *Advenella* species bioaugmented in activated sludge for high *p*-cresol removal. *New Biotechnol.* **33**, 305–310 (2016)
77. Xu P., Ma W., Han H., Jia S., Hou B.: Isolation of a naphthalene-degrading strain from activated sludge and bioaugmentation with it in a MBR treating coal gasification wastewater. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **94**, 358–364 (2015)
78. Yao Y.L., Lv Z.M., Zhu F.X., Min H., Bian C.M.: Successful bioaugmentation of an activated sludge reactor with *Rhodococcus* sp. YYL for efficient tetrahydrofuran degradation. *J. Hazard. Mater.* **261**, 550–558 (2013)
79. Yu F-B., Ali S.W., Guan L-B., Li S-P., Zhou S.: Bioaugmentation of a sequencing batch reactor with *Pseudomonas putida* ONBA-17, and its impact on reactor bacterial communities. *J. Hazard. Mater.* **176**, 20–26 (2010)
80. Zhang W., Li C.: Exploiting quorum sensing interfering strategies in gram-negative bacteria for the enhancement of environmental applications. *Front. Microbiol.* **6**, 1–15 (2016)
81. Zheng Y., Chai L-Y., Yang Z-H., Tang C-J., Chen Y-H., Shi Y.: Enhanced remediation of black liquor by activated sludge bioaugmented with a novel exogenous microorganism culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 6525–6535 (2013)
82. Zhou J., Xu Y., Qu Y., Tan L.: Decolorization of Brilliant Scarlet GR enhanced by bioaugmentation and redox mediators under high-salt conditions. *Bioresour. Technol.* **101**, 586–591 (2010)

II.2

Michalska J., Mroziak A. 2018. Zastosowanie bioaugmentacji w procesach biologicznego oczyszczania ścieków i utylizacji osadów. *Ochrona Środowiska*, 40(1): 35-44

Justyna Michalska, Agnieszka Mrozik

Zastosowanie bioaugmentacji w procesach biologicznego oczyszczania ścieków i utylizacji osadów

Przyrost liczby ludności, rozwój nowych technologii przemysłowych oraz intensyfikacja rolnictwa pochłaniają ogromne ilości wody, wytwarzając jednocześnie olbrzymie ilości ścieków, które – w zależności od źródła pochodzenia – zawierają różny ładunek związków nieorganicznych (jak zasady, kwasy, fosforany, azotany, chlorki, metale śladowe) oraz organicznych (jak białka, węglowodany, tłuszcze). W grupie zanieczyszczeń organicznych znajdują się także toksyczne związki chemiczne, w tym fenol i jego pochodne, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), pestycydy oraz farmaceutyki [1–6].

Podstawę współczesnej gospodarki ściekowej stanowi technologia polegająca na mineralizacji zanieczyszczeń przez różne grupy mikroorganizmów połączonych ze sobą w zaglomerowane struktury zwane osadem czynnym [7]. Prawidłowe funkcjonowanie oczyszczalni ścieków zależy zatem od składu oraz aktywności mikroorganizmów naturalnie występujących w ściekach i osadzie czynnym [8]. Niestety zmienny skład ścieków, w tym wahania temperatury, pH, stopnia zasolenia oraz zawartości tlenu rozpuszczonego, często przyczynia się do pogorszenia stanu funkcjonowania osadu czynnego, a nawet zamierania mikroorganizmów występujących w tym środowisku [9], czego wynikiem może być osłabienie lub całkowite zahamowanie procesu usuwania zanieczyszczeń ze ścieków, uwalnianie toksycznych substancji do środowiska oraz emisja uciążliwych odorów [10, 11].

Koncepcja procesu bioaugmentacji

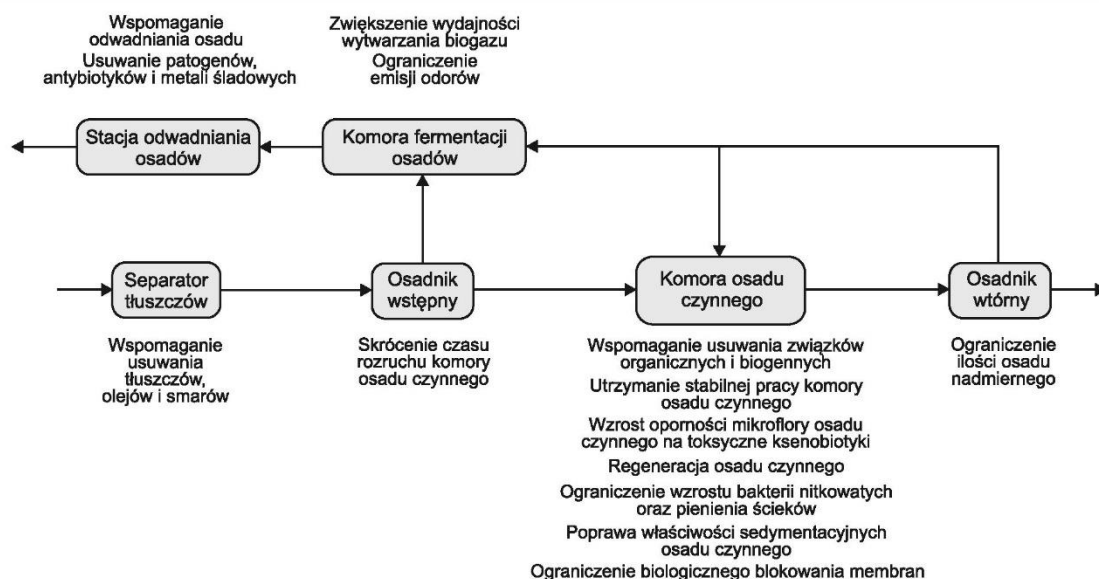
Atrakcyjnym rozwiązaniem problemów związanych z dużym ładunkiem zanieczyszczeń dopływających do oczyszczalni jest metoda bioaugmentacji. Polega ona na wprowadzeniu do osadu czynnego dodatkowej puli bakterii lub grzybów o znacznym potencjale degradacji konkretnych zanieczyszczeń, niewrażliwych na zmiany środowiskowe oraz o wysokiej tolerancji na substancje toksyczne. Inokulacja osadu takimi mikroorganizmami może nie tylko prowadzić do zwiększenia bioróżnorodności oraz biomasy mikroorganizmów bytujących w reaktorze biologicznym, przyspieszać rozkład zanieczyszczeń organicznych w ściekach, usprawniać proces usuwania związków azotu i fosforu, ale także zapobiegać nadmiernemu rozwojowi bakterii nitkowatych, poprawiać właściwości sedymentacyjne

osadu, przeciwdziałać powstawaniu piany, wspomagać zdolności adaptacyjne mikroorganizmów autochtonicznych do zmian parametrów operacyjnych procesu oczyszczania oraz wspierać proces regeneracji osadu. Ze względu na możliwość stosowania bioaugmentacji na różnych etapach biologicznego oczyszczania ścieków, a także przeróbki osadów, może ona w znaczącym stopniu usprawnić pracę wielu oczyszczalni ścieków (rys. 1) [12].

Mikroorganizmy o pożądanym cechach degradacyjnych pozyskuje się do bioaugmentacji przez ich selekcję z tego samego lub innego źródła o identycznym lub podobnym typie zanieczyszczeń, a następnie ich namnożenie w warunkach laboratoryjnych [13–15]. Wprowadzenie wyselekcjonowanych mikroorganizmów do osadu czynnego, z którego naturalnie pochodziły nosi nazwę bioaugmentacji autochtonicznej lub reinokulacji mikroorganizmami autochtonicznymi, natomiast ich introdukowanie do innego osadu określane jest mianem bioaugmentacji allochtonicznej lub biozobogacenia. Do osadu czynnego można również wprowadzać mikroorganizmy genetycznie modyfikowane o wzmożonej aktywności degradacyjnej względem konkretnego zanieczyszczenia (bioaugmentacja genetyczna) [16]. Powszechną metodą jest także stosowanie komercyjnych biopreparatów, zawierających zdefiniowane konsorcja mikroorganizmów i/lub enzymy czy biosurfaktanty. Aby metoda bioaugmentacji mogła stanowić skuteczne narzędzie w zwiększaniu sprawności funkcjonowania osadu czynnego, najistotniejszym elementem takiej operacji jest dobór odpowiednich mikroorganizmów do inokulacji.

Czynniki ograniczające bioaugmentację

Jednym z głównych czynników ograniczających pomysły przebieg bioaugmentacji jest słaba przeżywalność mikroorganizmów wprowadzonych do osadu czynnego, ponieważ ich liczebność w osadzie zazwyczaj w krótkim czasie drastycznie maleje. Autorzy pracy [17] badając przeżywalność szczepu *Pseudomonas putida* ONBA-17 inokulowanego do osadu czynnego w sekwencyjnym reaktorze porcjowym (SBR) zaobserwowali drastyczne zmniejszenie liczebności bakterii z $6,4 \cdot 10^6$ jtk/cm³ do $1,4 \cdot 10^3$ jtk/cm³ w ciągu 36 d. Inokulowane bakterie początkowo pływały wolno wśród klaczków osadu czynnego, natomiast wraz z upływem czasu coraz więcej identyfikowano ich wewnątrz wakuoli pierwotniaków. Przyczyną śmierci inokulantów mogły być brak zdolności konkurencyjności z rodzimą mikroflorą o związki odżywcze, obecność inhibitorów,

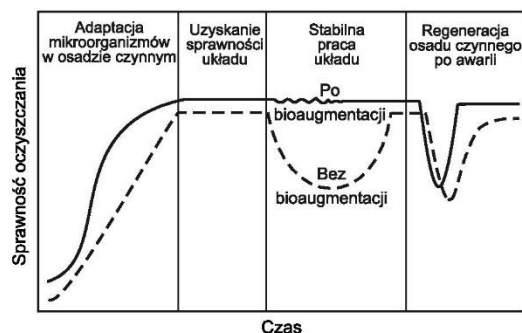


Rys. 1. Zastosowanie bioaugmentacji na różnych etapach biologicznego oczyszczania ścieków
Fig. 1. Application of bioaugmentation at various stages of biological wastewater treatment process

drapieżnictwo ze strony pierwotniaków czy infekcja bakteriofagami [18, 19]. Sposobem zwiększania przeżywalności introdukowanych mikroorganizmów jest wprowadzanie dużej ich biomasy do osadu w zakresie 10^6 - 10^7 kom./ cm^3 [20] oraz kilkukrotne wprowadzenie mikroorganizmów (successive bioaugmentation) w zależności od tempa rozkładu konkretnych związków chemicznych [21]. Innym rozwiązaniem jest unieruchomienie mikroorganizmów na różnych nośnikach naturalnych i syntetycznych, co wspomaga nie tylko ich zatrzymanie i zwiększenie biomasy w bioreaktorze, ale także eliminuje konieczność konkurencji z innymi drobnoustrojami o związki odżywcze. Nośniki stosowane do immobilizacji mogą także zapewnić inokulantom ochronę przed drapieżnikami oraz zmniejszyć narażenie na zmiany czynników środowiskowych oraz toksyczne działanie związków chemicznych [22]. Unieruchomione na nośnikach mikroorganizmy zwykle wykazują większą aktywność metaboliczną niż komórki swobodnie zawieszone w osadzie czynnym [23].

Niemniej ważne od doboru odpowiednich szczepów do inokulacji, sposobu ich dostarczenia do środowiska oraz wzajemnych interakcji z rodzimą mikroflorą są także czynniki abiotyczne. Fluktuacjom składu chemicznego ścieków mogą towarzyszyć zmiany parametrów operacyjnych procesu biologicznego oczyszczania ścieków, takich jak temperatura, pH, zasolenie oraz zawartość tlenu rozpuszczonego [24]. Ponieważ czynniki te mają istotny wpływ na właściwości adsorpcyjne i sedymentacyjne osadu czynnego oraz aktywność i bioróżnorodność mikroorganizmów rodzimych, ich zmiany mogą być przyczyną zaburzeń w funkcjonowaniu tego ekosystemu [25, 26]. Bioaugmentacja osadu czynnego z użyciem bakterii łatwo adaptujących się do zmieniających się warunków środowiskowych może być stosowana w celu ochrony struktury zespołów mikroorganizmów naturalnie występujących w tym środowisku. W związku z tym może ona wspomagać utrzymanie stałych warunków operacyjnych procesu oczyszczania ścieków, pozwalając na skrócenie nie tylko fazy adaptacji mikroorganizmów, ale także czasu rozruchu reaktora biologicznego oraz jego stabilną pracę (rys. 2) [27].

Obniżenie temperatury ścieków, zwłaszcza zimą, często jest przyczyną wydłużenia czasu rozruchu reaktora biologicznego ze względu na osłabienie wzrostu mikroorganizmów w osadzie czynnym. Wynikiem tego zjawiska jest zmniejszenie intensywności usuwania ze ścieków związków węgla, fosforu, a zwłaszcza azotu [28]. Względna aktywność osadu czynnego w temperaturze 20°C stanowi 60 - 70% jego aktywności maksymalnej, podczas gdy w temperaturze 10°C względna aktywność wynosi zaledwie 25% [29]. Obniżenie temperatury ścieków poniżej 5°C prowadzi natomiast do całkowitego zatrzymania procesu nityfikacji, ze względu na zahamowanie wzrostu bakterii z rodzajów *Nitrosomonas* i *Nitrobacter*. Badania przeprowadzone w dwóch oczyszczalniach ścieków komunalnych w Chinach, odbierających ścieki o zmiennej temperaturze w zakresie 13 - 23°C , wykazały, że zwiększenie stopnia recyrkulacji biomasy do komór nityfikacyjnych nie wpłynęło na skrócenie czasu rozruchu reaktorów biologicznych, który wynosił w tych oczyszczalniach odpowiednio 58 d i 89 d [25, 30]. Z kolei z innej pracy wynika, że zastosowanie bioaugmentacji może przeciwdziałać wpływowi niskich temperatur na mikroorganizmy naturalnie występujące w osadzie czynnym. Po wprowadzeniu do osadu



Rys. 2. Wpływ bioaugmentacji osadu czynnego na przebieg biologicznego oczyszczania ścieków

Fig. 2. Effect of activated sludge bioaugmentation on the course of biological wastewater treatment process

konsorcjum mikroorganizmów allochtonicznych reprezentowanych przez *Proteobacteria*, *Bacterioides*, *Nitrospirales*, *Cyanobacteria* i *Bacillus* w trzech konwencjonalnych oczyszczalniach ścieków w Chinach nastąpiło skrócenie czasu rozruchu reaktora do 12÷15 d, pomimo spadku temperatury poniżej 15°C [31].

Na obniżenie wydajności procesu oczyszczania ścieków mogą mieć również wpływ zmiany wartości pH ścieków w reaktorze biologicznym. Utrzymanie optymalnego pH w procesie osadu czynnego (6,5÷8,0) odgrywa bardzo ważną rolę w prawidłowym rozwoju mikroorganizmów i formowaniu kłaczków. Ponadto wartość tego wskaźnika wpływa na właściwości sedymentacyjne osadu oraz skuteczność biodegradacji zanieczyszczeń w ściekach [32]. Wartości pH poniżej 5 lub powyżej 10 mogą spowodować spadek aktywności mikroorganizmów autochtonicznych i zmniejszenie ich bioróżnorodności [33]. Badania autorów pracy [34] wykazały, że bioaugmentacja osadu czynnego alkalofilnym szczepem *Pseudomonas* sp. JY2 była szczególnie skuteczna podczas oczyszczania silnie zasadowych (pH=10) ścieków fenolowych. Znaczna tolerancja tego szczepu na wysokie wartości pH skutkowałą skróceniem czasu rozruchu reaktora SBR do 1,5 d, usunięciem 90% początkowej ilości fenolu (550 mg/dm³) i spadkiem wartości pH z 10 do 8. Równocześnie w reaktorze niepoddany bioaugmentacji nie nastąpiła zmiana wartości pH, a mineralizację fenolu na poziomie 90% stwierdzono po 3 d pracy reaktora. W innych badaniach osad w lagunie osadowej, narażonej na ścieki z przemysłu papierniczego i wahania pH w zakresie 3÷10, poddano bioaugmentacji szczepem *Zoogloea resiniphila* DhA-35, zdolnym do flokulacji i rozkładu kwasu dehydroabietynowego (DhA). Wykazano, że zabieg ten doprowadził do całkowitej mineralizacji DhA (6 mg/dm³) w ciągu 1÷2 d, zarówno w lagunie o pH=3, jak i w lagunie o pH=10 [35]. Niepoddanie bioaugmentacji osadu w lagunie o pH=3 skutkowało całkowitym zahamowaniem rozkładu DhA, natomiast wzrost pH do 10 spowodował wydłużenie czasu rozkładu badanego związku do 4 d. Dane literaturowe wskazują, że nie zawsze bioaugmentacja osadu czynnego mikroorganizmami zdolnymi do wzrostu w wysokim pH odnosi oczekiwany skutek. Udowodniono na przykład, że inokulacja osadu czynnego oczyszczającego ścieki petrochemiczne o zmiennej wartości pH, z użyciem konsorcjum sześciu szczepów z rodzajów *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Brevibacterium* i *Nocardia* zdolnych do wzrostu w pH=10 spowodowała całkowite zahamowanie procesu usuwania zanieczyszczeń zarówno w osadzie bioaugmentowanym, jak i niepoddanym bioaugmentacji [33].

Ścieki przemysłowe, zwłaszcza z przemysłu chemicznego, mogą zawierać wysoką zawartość soli, sięgającą do 4÷5 g/dm³. Tak znaczna ilość soli w ściekach może być przyczyną zahamowania aktywności metabolicznej mikroorganizmów autochtonicznych, a nawet prowadzić do plazmolizy komórek [36]. Autorzy pracy [37] po inokulacji osadu czynnego halofilnym szczepem *Halobacter halobium* w reaktorze SBR oczyszczającym ścieki syntetyczne o wzrastającym zasoleniu (0÷6%) stwierdzili, że wzrost zawartości NaCl do 5% w osadzie bioaugmentowanym, w porównaniu do osadu kontrolnego, skutkowałą większą sprawnością usuwania zanieczyszczeń organicznych oraz azotu amonowego i fosforanów, odpowiednio o 26% oraz 15% i 10%. Dodatkowo wprowadzenie badanego szczepu bakterii do osadu czynnego przyczyniło się do poprawy jego właściwości sedymentacyjnych, co spowodowało zmniejszenie wartości indeksu osadu do 76 cm³/g w stosunku

do osadu kontrolnego (97 cm³/g). W badaniach [38] udokumentowano, że stężenie soli, przy którym nie obserwowano istotnego pogorszenia sprawności oczyszczania ścieków osadem czynnym bioaugmentowanym halofilnym szczepem *Zunongwangia profunda* oraz innymi szczepami bakterii morskich oraz niepoddanym bioaugmentacji, wyniosło odpowiednio 7÷8% oraz 6÷7%.

Usuwanie toksycznych związków chemicznych

W ostatnich latach przeprowadzono wiele badań dotyczących intensyfikacji rozkładu toksycznych związków chemicznych, w tym związków fenolowych, WWA, barwników, farmaceutyków, pestycydów czy związków ropopochodnych przez osad czynny wzbogacony wyselekcjonowanymi z różnych źródeł pojedynczymi szczepami bakterii i grzybów mikroskopowych oraz ich konsorcjami (tab. 1).

Jako przykład mogą posłużyć badania autorów pracy [15], którzy po inokulacji osadu czynnego, zasilanego ściekami z 4-metylofenolem (4-MF) (750 mg/dm³), alkalofilnym szczepem *Advenella* sp. LVX4 stwierdzili całkowity rozkład tego związku w ciągu około 100 h, przy czym mikroorganizmy w osadzie niebioaugmentowanym były zdolne do degradacji jedynie 44% wyjściowej ilości 4-MF. W innych badaniach [42] przeprowadzono skuteczną bioaugmentację osadu czynnego szczepem *Streptomyces* sp. QWE-35, zdolnym do rozkładu naftalenu. W ciągu 10 d uzyskano większą o 36% sprawność usuwania tego związku, w porównaniu do jego rozkładu w osadzie kontrolnym.

Bioaugmentacja osadu czynnego z udziałem grzybów przeprowadzana jest najczęściej w celu zwiększenia skuteczności oczyszczania ścieków zawierających znaczny ładunek leków, związków fenolowych oraz barwników. Potwierdzają to badania autorów pracy [51], którzy wykazali, że inokulacja osadu czynnego grzybem *Trametes versicolor*, wydzielającym takie enzymy, jak lakaza, peroksydaza manganowa i ligninowa, spowodowała wzrost wydajności transformacji hydroksytyrozolu oraz tyrozolu, odpowiednio z 40% do 75% oraz z 31% do 55%. Z kolei inne badania [46] potwierdziły, że bioaugmentacja osadu czynnego, zasilanego ściekami fenolowymi, szczepem *Phanerochaete chrysosporium* przyczyniła się do wzrostu szybkości rozkładu fenolu z 0,84 g/(g·d) do 1,45 g/(g·d) (w odniesieniu do suchej masy organicznej osadu). Skuteczną bioaugmentację osadu czynnego, oczyszczającego ścieki zawierające barwnik Acid Red B (ARB), udało się także przeprowadzić szczepem *Candida tropicalis* TL-F1, skutkiem czego było skrócenie czasu rozkładu barwnika (25 mg/dm³ i 50 mg/dm³), odpowiednio z 3 d do 2 d oraz z 6 d do 3 d [52].

Znanych jest wiele przykładów intensyfikacji rozkładu toksycznych związków chemicznych przez osad czynny bioaugmentowany zdefiniowanymi konsorcjami mikroorganizmów. Takie mieszane kultury drobnoustrojów zazwyczaj są zdolne do rozkładu wielu związków jednocześnie, co wynika z uzupełniania się ich zdolności degradacyjnych. Taka metoda wydaje się bardziej skuteczna w eliminacji niebezpiecznych zanieczyszczeń ze ścieków, w porównaniu z inokulacją osadu czynnego pojedynczymi szczepami. Potwierdzają to wyniki badań autorów pracy [41], którzy bioaugmentowali osad czynny oczyszczający ścieki zawierające 2,4-dichlorofenol (2,4-DCP) (50 mg/dm³) pojedynczymi szczepami *Achromobacter* sp. i *Flavobacterium breve*, zdolnymi do rozkładu fenolu i jego pochodnych, a także konsorcjum będącym ich mieszaniną. Największą wydajność rozkładu 2,4-DCP, wynoszącą 88÷99%,

Tabela 1. Wybrane szczepy bakterii i grzybów mikroskopowych oraz konsorcja mikroorganizmów do bioaugmentacji osadu czynnego
Table 1. Strains of bacteria and filamentous fungi as well as consortia of microorganisms selected for bioaugmentation of activated sludge

Mikroorganizm	Związek – zawartość	Ścieki	Kraj – miejsce badań	Źródło
<i>Comamonas testosteroni</i> bdq06	fenol – 290 mg/dm ³	z przemysłu farbiarskiego/ /komunalne (1/2, 1/1, 2/1)	Chiny – laboratorium	[39]
	chinolina – 316 mg/dm ³			[40]
<i>Paracoccus denitrificans</i> W12	pirydyna – 250+500 mg/dm ³	z przemysłu farmaceutycznego	Chiny – laboratorium	[41]
<i>Pseudomonas</i> sp. HF-1	nikotyna – 40+250 mg/dm ³	z przemysłu tytoniowego/ /woda wodociągowa (7/100)		[42]
<i>Streptomyces</i> sp. QWE-35	naftalen – 38,2 mg/dm ³	z gazyfikacji węgla		[43]
<i>Sphingobium</i> sp. BID32	bisfenol A – 0,0017 mg/dm ³	komunalne	Stany Zjednoczone – laboratorium	[44]
<i>Sphingopyxis</i> sp. TrD1				
<i>Rhodococcus</i> sp. p52 mający plazmidy pDF01 i pDF02 (geny kodujące dioksygenazę)	dibenzofuran – 300 mg/dm ³	modelowe	Chiny – laboratorium	[45]
<i>Escherichia coli</i> JM109 (pGEX-AZR), mająca plazmid pGEX4T-1 (gen kodujący azoreduktazę)	Direct Blue – 71 mg/dm ³ , 150+550 mg/dm ³			[46]
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	fenol – 1 800 mg/dm ³			koksownicze
<i>Hansenula polymorpha</i>	formaldehyd, – 488 mg/dm ³ i 1128 mg/dm ³	z przemysłu chemicznego	Polska – laboratorium	[48]
Konsorcjum <i>Cryptococcus humicolus</i> MCN2 i bakterii rozkładających cyjanki	cyjanek potasu – 25+50 mg/dm ³	modelowe	Korea – laboratorium	[49]
Konsorcjum <i>Achromobacter</i> sp. i <i>Flavobacterium breve</i> oraz innych nieoznaczonych bakterii	2,4-dichlorofenol – 50 mg/dm ³		Chiny – laboratorium	[50]
<i>Rhodococcus</i> sp. YYL, <i>B. cereus</i> MLY1 i <i>B. aquimaris</i> MLY2	tetrahydrofuran – 1442 mg/dm ³			

uzyskano w ciągu 30 d w osadzie inokulowanym tym konsorcjum, natomiast w osadzie niebioaugmentowanym oraz bioaugmentowanym pojedynczymi szczepami skuteczność rozkładu 2,4-DCP wynosiła odpowiednio 46÷61% i 78÷89%. W innych badaniach [53] wykorzystano mieszane konsorcjum bakteryjne VN11, obejmujące szczepy *Providencia* sp. VN11A, *Brevibacillus* sp. VN11B, *Alcaligenes* sp. VN11C i *Pseudomonas* sp. VN11D, do bioaugmentacji osadu czynnego zasilanego typowymi ściekami komunalnymi. Wykazano, że wprowadzenie tych mikroorganizmów do osadu czynnego umożliwiło skuteczne usuwanie różnego rodzaju zanieczyszczeń w warunkach anoksycznych oraz w warunkach tlenowych, w temperaturze 37°C oraz pH równym 7,0. Inokulacja osadu tym konsorcjum przyczyniła się nie tylko do eliminacji fenolu ze ścieków (89%), ale także związków fosforu (80%), azotu (86%) i siarki (81%).

Wprowadzenie do osadu czynnego mikroorganizmów modyfikowanych genetycznie, będących donorami genów katabolicznych zlokalizowanych w plazmidach lub innych ruchomych elementach genetycznych, takich jak transpozony czy wyspy genomowe, stanowi alternatywę dla klasycznej bioaugmentacji. Metoda ta nie jest jednak powszechnie stosowana w systemach biologicznego oczyszczania ścieków, ze względu na obawy związane z horyzontalnym transferem genów [54]. Ponadto zmodyfikowane szczepy bakterii o wysokiej aktywności degradacyjnej po wprowadzeniu do osadu czynnego często trudno adaptują się do warunków panujących w tym środowisku, tracą zdolności rozkładu lub transformacji toksycznych zanieczyszczeń i w konsekwencji zamierają. Pomyślnie zakończoną bioaugmentację osadu czynnego oczyszczającego ścieki z dibenzofuranem (DBF) w ilości 300 mg/dm³

przeprowadzono z użyciem modyfikowanych bakterii *Rhodococcus* sp. p52 [44]. Stwierdzono, że w inokulowanym osadzie czynnym całkowity rozkład DBF nastąpił w czasie 60 d, podczas gdy w osadzie nieinokulowanym biodegradacja tego związku nie zachodziła. Świadczyło to o sprawnym transferze genów katabolicznych zlokalizowanych w plazmidach pDF01 i pDF02 dawcy do mikroorganizmów autochtonicznych.

Usuwanie związków biogenych

Bioaugmentacja może być korzystnym rozwiązaniem problemów eksploatacyjnych na różnych etapach oczyszczania ścieków, między innymi w celu zwiększenia wydajności procesu nityfikacji podczas niskich temperatur (jesień-zima). Spadek temperatury poniżej 15°C wpływa nie tylko na obniżenie szybkości wzrostu bakterii nityfikacyjnych w reaktorze, ale również oddziałuje negatywnie na ich aktywność i szybkość rozkładu substratów, adsorpcję w osadzie czynnym oraz jego zdolności sedymentacyjne [55]. Pokonanie tych trudności wymaga często wydłużenia czasu retencji osadu czynnego w reaktorze biologicznym, co wiąże się z koniecznością zwiększenia pojemności komór nityfikacyjnych. W wielu konwencjonalnych oczyszczalniach ścieków zabieg ten jest często niemożliwy do wykonania z uwagi na koszty. Ponadto zwiększenie czasu przetrzymania biomasy w osadniku może dodatkowo zaburzać proces usuwania związków fosforu ze ścieków. Realnym rozwiązaniem tych problemów było wprowadzenie do osadu czynnego dodatkowej puli bakterii nityfikacyjnych [56, 57], co pozwoliło na zmniejszenie pojemności reaktorów nawet o 50% i zwiększenie szybkości nityfikacji o około 60% [58].

Znaczną poprawę sprawności nityfikacji w temperaturze 10°C zaobserwowano w wyniku bioaugmentacji osadu czynnego biomasa mikroorganizmów utleniających azot amonowy oraz azotyny [55]. Po wprowadzeniu do reaktora SBR dodatkowej puli bakterii nityfikacyjnych wydajność utleniania azotu amonowego w ściekach modelowych oraz rzeczywistych wzrosła odpowiednio z 48% do 85% oraz z 82% do 88%.

Techniczne wykorzystanie bioaugmentacji w oczyszczalniach ścieków daje głównie technologia BABE (bioaugmentation batch enhanced). W tym procesie ścieki sklarowane poddawane są nityfikacji w reaktorze SBR w strumieniu bocznym, a namnożona biomasa bakterii nityfikacyjnych zasila reaktor główny. Zastosowanie technologii BABE w oczyszczalniach ścieków w Holandii, odbierających ścieki o zbliżonym ładunku zanieczyszczeń, doprowadziło do obniżenia w nich ilości azotu ogólnego z 13 mgN/dm³ do 9 mgN/dm³ oraz azotu amonowego z 13 mgN/dm³ do 5 mgN/dm³. Usprawnienie procesu nityfikacji w oczyszczalniach ścieków może się również odbywać z wykorzystaniem metody InNitri (inexpensive nitrification), polegającej na namnożeniu mikroorganizmów nityfikacyjnych w odcieku fermentacyjnym oraz systemu BAR (bioaugmentation regeneration), w którym biomasa bakterii nityfikacyjnych w odcieku fermentacyjnym wprowadza się do napowietrzonego osadu nadmiernego [58].

Osiągnięcie jednoczesnego usuwania związków węgla, azotu i fosforu ze ścieków wiąże się z koniecznością naprzemiennego stosowania warunków beztlenowych, anoksycznych i tlenowych, co nie zawsze jest możliwe w konwencjonalnych systemach oczyszczania ścieków. Uzyskanie wysokiej sprawności usuwania substancji biogennej ze ścieków w takich warunkach wymaga długiego czasu aklimatyzacji osadu czynnego do zmieniającej się zawartości lub braku tlenu. Bioaugmentacja osadu czynnego pozwala na przezwyciężenie tych problemów, eliminując jednocześnie konieczność wdrażania drogiego rozwiązań technologicznych. Badania autorów pracy [59] wykazały, że inokulacja osadu w reaktorze SBR, wzbogaconego wcześniej biomasa bakterii nityfikacyjnych i mikroorganizmami akumulującymi polifosforany (polyphosphate-accumulating organisms – PAO) pozwoliła na jednoczesne i bardzo wydajne usuwanie ze ścieków azotu i fosforu w ciągu dwóch miesięcy prowadzenia eksperymentu. W innych badaniach [60] porównywano wydajność usuwania fosforu ze ścieków przez osad czynny inokulowany pojedynczymi szczepami *Acinetobacter lwoffii* ATCC 19002 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 oraz ich konsorcjum. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów pokazały, że jedynie wprowadzenie do reaktora SBR szczepu *A. lwoffii* przyczyniło się do całkowitego usunięcia fosforanów (20 mgPO₄³⁻/dm³) ze ścieków w ciągu 30 d, natomiast w tym samym czasie w osadzie czynnym bioaugmentowanym *P. aeruginosa* ATCC 27853 oraz mieszaną populacją bakterii eliminacja fosforanów była znacznie mniejsza i wynosiła odpowiednio 25% i 20%.

Usuwanie związków tłuszczowych oraz ograniczenie emisji odorów

Ścieki przemysłowe są nie tylko źródłem toksycznych związków chemicznych, ale mogą zawierać również znaczną ilość tłuszczów, olejów i smarów, stanowiących poważny problem w biologicznych systemach oczyszczania ścieków. Substancje te tworzą na powierzchni kłaczków

oleistą powłokę uniemożliwiającą dyfuzję tlenu oraz transport substancji odżywczych. Mogą one także zwiększać awaryjność pomp oraz urządzeń do rozprowadzania powietrza w reaktorach biologicznych. Aby zapobiec takim niepożądanym zjawiskom, autorzy pracy [61] wykorzystali nowy, rewolucyjny system oczyszczania ścieków BioAmpTM, w którym namnażali pięć szczepów bakterii o wysokim potencjale rozkładu tłuszczów (*Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* i *B. thuringiensis*), a następnie zastosowali je do oczyszczania ścieków pochodzących z akademickiej stołówki. Ścieki te charakteryzowały się wartością ChZT w zakresie 990÷350 mgO₂/dm³ oraz zawartością kwasów tłuszczowych w ilości 117÷433 mg/dm³. Badania przeprowadzono w separatorach tłuszczu, będących elementem lokalnej oczyszczalni ścieków. Uzyskane wyniki wykazały, że zastosowanie systemu BioAmpTM było bardzo skuteczne, gdyż stężenie tłuszczów w ściekach zmniejszyło się z wartości początkowej 281 mg/dm³ do 168 mg/dm³, w tym stężenie kwasów tłuszczowych zmalało o 59%, a ChZT o 39%. Obecność związków tłuszczowych w ściekach może także stymulować rozwój mikroorganizmów nitkowatych w osadzie czynnym, będących przyczyną jego pęcznienia. Skutecznym rozwiązaniem tego problemu jest wprowadzenie do osadu czynnego bakterii zawierających enzymy prowadzące hydrolizę tłuszczów [12].

Oczyszczalnie ścieków często są źródłem uciążliwych odorów. Ograniczenie ich emisji oraz neutralizacja substancji złoonych, ze względu na ich złożoną budowę chemiczną oraz wysokie koszty dezodoryzacji, są często utrudnione. Rozwiązaniem tego problemu może być bioaugmentacja osadu czynnego szczepami bakterii *Pseudomonas stutzeri* TR2 oraz *Thiobacillus denitrificans* wspomagającymi usuwanie kłopotliwych gazów zawierających związki siarki i azotu [62, 63].

Utylizacja osadów ściekowych

Strategia bioaugmentacji może być z powodzeniem stosowana nie tylko w procesie oczyszczania ścieków, lecz także podczas utylizacji osadów ściekowych w celu zwiększenia wydajności pozyskiwania biogazu [39, 64]. Po wprowadzeniu do komór fermentacyjnych niezależnie dwóch szczepów bakterii – mezofilnego *Enterobacter cloacae* (DSM 30054) i termofilnego *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (DSM 8903) – wykazano pozytywną korelację pomiędzy obecnością tych mikroorganizmów a wzrostem produkcji biogazu. Jednocześnie potwierdzono zdolność obu szczepów bakterii do inkorporacji w strukturę autochtonicznych zespołów mikroorganizmów występujących w reaktorze, co umożliwiło utrzymanie produkcji biogazu na wysokim poziomie [65].

Biologiczny rozkład zanieczyszczeń zawartych w ściekach prowadzi do przyrostu osadu czynnego, czyli powstania osadu nadmiernego. Ze względu na wymogi środowiskowe w zakresie zagospodarowania osadów, stale rosną koszty ich utylizacji. Zastosowanie mikroorganizmów do bioaugmentacji osadu czynnego może wspomagać skuteczność oczyszczania ścieków, nie powodując przy tym nadmiernego wzrostu biomasy. Potwierdzają to badania autorów pracy [66], którzy wykazali, że bioaugmentacja osadu czynnego, zasilanego ściekami garbarskimi, konsorcjum bakteryjnym BM-S-1 nie tylko zwiększyła wydajność ich oczyszczania, ale także przyczyniła się do ograniczenia ilości osadu nadmiernego.

Powstający w procesie oczyszczania ścieków osad nadmierny oraz ścieki oczyszczone nierzadko zawierają metale śladowe oraz antybiotyki. Metody fizyczne i chemiczne stosowane w celu eliminacji tych zanieczyszczeń są mało skuteczne i mogą być dodatkowo przyczyną powstawania toksycznych i rakotwórczych związków ograniczających wzrost mikroorganizmów. W celu zwiększenia wydajności usuwania jonów nikiel(II) i/lub cefaleksyny (antybiotyk) przeprowadzono bioaugmentację szczepem *Bacillus subtilis* 2012WTNC czterech rodzajów ścieków oczyszczonych – próbka kontrolna (E1) oraz ścieki zawierające odpowiednio jony nikiel w ilości 10 mgNi/dm^3 (E2), cefaleksynę w ilości 1 g/dm^3 (E3) oraz oba zanieczyszczenia w tych samych ilościach (E4). Stwierdzono, że obecność tego szczepu spowodowała zmniejszenie zawartości jonów nikiel w ściekach E2 i E4 odpowiednio o 97% i 66%, a cefaleksyny w ściekach E3 i E4 odpowiednio o 14% i 56% w porównaniu do próbki kontrolnej E1 [67].

Wiele badań wykazało również, że bioaugmentacja osadów ściekowych zdefiniowanymi mikroorganizmami może być z powodzeniem wykorzystana w procesie biologicznego zawarty w nich metali. Szczególnie przydatne okazały się w tym celu bakterie z rodzaju *Acidithiobacillus*, które nie tylko wspomagają ten proces, ale także ułatwiają odwadnianie osadów, zmniejszając zawartość obecnych w nich zewnątrzkomórkowych substancji egzopolisacharydowych i związanej z nimi wody, także obniżają wartość pH. Niestety wzrost tych mikroorganizmów jest często ograniczony ze względu na toksyczność występujących w osadach rozpuszczalnych substancji organicznych. Związki te mogą być jednak rozkładane przez grzyby mikroskopowe, co wspomaga proces utylizacji osadów. Dzięki obecności strzępek, grzyby wylapują cząstki stale obecne w osadzie ściekowym zwiększając w ten sposób jego podatność na bioseparację oraz odwadnianie. Stwierdzono, że inokulacja osadu szczepem *Mucor hiemalis* spowodowała zmniejszenie oporu właściwego osadu o około 70% w ciągu 6 d w stosunku do próbki kontrolnej [68]. Z kolei w pracy [69] wykazano, że inokulacja osadu szczepem *Mucor circinelloides* ZG-3 prowadziła do rozkładu substancji organicznych oraz wspomagała aktywność introdukowanego w drugiej kolejności szczepu *Acidithiobacillus ferrooxidans* LX5, przyczyniając się do ponad 8-krotnego wzrostu skuteczności odwadniania osadu. W kolejnych badaniach [70] bioaugmentowano osad czynny grzybem *Penicillium expansum* BS30 w celu równoczesnego usunięcia mikroorganizmów patogennych oraz zmniejszenia ilości osadu nadmiernego. Obecność badanego szczepu w tym środowisku przyczyniła się do ograniczenia zawiesin ogólnych i lotnych w osadzie o około 50% oraz do zwiększenia jego podatności na odwadnianie. Ponadto obecność tego szczepu wywołała spadek liczebności bakterii fekalnych z grupy *coli* oraz z rodzaju *Salmonella*, odpowiednio z 10^7 jtk/cm^3 do 10^5 jtk/cm^3 oraz z 10^7 jtk/cm^3 do 10^3 jtk/cm^3 .

Biopreparaty do bioaugmentacji

Bioaugmentację osadu czynnego w oczyszczalniach ścieków można prowadzić z użyciem komercyjnie dostępnych konsorcjów mikroorganizmów – biopreparatów, które są dostępne najczęściej w postaci roztworów oraz liofilizatów, co zapewnia utrzymanie stałego stężenia mikroorganizmów dostarczanych do reaktora biologicznego. Oprócz wyspecjalizowanych drobnoustrojów w skład

biopreparatów mogą wchodzić także enzymy przyspieszające rozkład zanieczyszczeń w ściekach, niezbędne do wzrostu drobnoustrojów makro- i mikroelementy, biopolimery, witaminy oraz substancje regulujące pH i ciśnienie osmotyczne [71, 72]. Biopreparaty znajdują szerokie zastosowanie na wielu etapach procesu biologicznego oczyszczania ścieków. Wykorzystywane są w celu intensyfikacji rozkładu tłuszczów, olejów i smarów (np. Sybron Bi-Chem 1003FG), kontroli pęcznienia i przyrostu osadu oraz ograniczenia ilości osadu nadmiernego (np. MS14 i OASIS), wspomaganie oczyszczania ścieków w niskich temperaturach oraz intensyfikacji procesu nityfikacji (np. MicroClear[®], MicroChill[™] Ammo-neX), usuwania zanieczyszczeń toksycznych (np. Pheno-Bac i Inbalance), poprawy jakości osadu czynnego (np. MICROCAT), ograniczenia odorów (np. BCP50) oraz utrzymania stabilności procesu oczyszczania ścieków (np. BiOWiSH[™] Aqua, BioRemove[™] 5100). Niestety brak szczegółowego składu mikrobiologicznego i chemicznego biopreparatów z uwagi na ich ochronę patentową sprawia, że znacznie trudniej jest przewidzieć los tych inokulantów w osadzie czynnym w porównaniu z losem zdefiniowanych konsorcjów drobnoustrojów.

Autorzy pracy [73] wykazali przydatność biopreparatu handlowego PL 4420 L 620442 firmy Aquaprox, obejmującego grzyby pleśniowe (*Aspergillus niger*, *Mucor hiemalis* i *Galactomyces geotrichum*) do intensyfikacji usuwania zanieczyszczeń z modelowych i rzeczywistych ścieków mleczarskich. Z badań w skali laboratoryjnej wynika, że wprowadzenie grzybów do reaktora biologicznego skutkowało wzrostem skuteczności usuwania zanieczyszczeń oznaczanych jako ChZT z 55% do 75%. Z kolei o przydatności tego biopreparatu zastosowanego w oczyszczalni pilotowej świadczył spadek wartości stosunku ChZT/BZT₅ ścieków z 18,2 (surowe) do 6,8 (oczyszczone). Z badań przeprowadzonych przez innych autorów [72] wynika, że biopreparaty mogą być także stosowane w procesie stabilizacji osadów ściekowych w celu zwiększenia biomasy mikroorganizmów odpowiedzialnych za rozkład związków organicznych. Po wprowadzeniu do osadu ściekowego, pochodzącego z otwartej komory fermentacyjnej, dwóch biopreparatów Eco Tabs[™] Pond Tablets oraz Eco Tabs[™] Eco Granular Shock, zawierających szczepy bakterii z rodzajów *Pseudomonas* i *Bacillus*, zaobserwowano znaczący wzrost ogólnej liczby bakterii heterotroficznych oraz grzybów pleśniowych, co korespondowało z wysokim poziomem aktywności dehydrogenaz w tym środowisku. Nie zawsze jednak bioaugmentacja osadu czynnego komercyjnymi preparatami przynosi oczekiwany skutek. Nie zauważono na przykład pozytywnego wpływu biopreparatu Sybron Bi-Chem 1003FG, wprowadzonego do osadu czynnego zasilanego ściekami mleczarskimi, na proces eliminacji związków tłuszczowych [74].

Inne zastosowania bioaugmentacji

Bioaugmentacja może być także z powodzeniem stosowana do poprawy stanu fizjologicznego osadu czynnego. Autorzy pracy [75] w wyniku bioaugmentacji osadu czynnego, zasilanego ściekami fenolowymi, sporami grzyba *Phanerochaete* sp. HSD uzyskali poprawę procesu formowania kłaczków. Po 5 d od momentu inokulacji osadu zaobserwowali pojawienie się licznych granulek tlenowych, natomiast w 9. dobie eksperymentu stwierdzili, że 74% osadu występuje w postaci kłaczków. Ponadto granule wytworzone w bioaugmentowanym osadzie były

stabilne przez 150 d, co wiązało się jednocześnie z usuwaniem zanieczyszczeń organicznych na poziomie 98%, przy czym w osadzie czynnym nieinokulowanym proces granulacji rozpoczął się dopiero po 30 d. W innych badaniach [76] przeprowadzono bioaugmentację osadu czynnego szczepem *Comamonas* sp. MQ oraz rekombinantem *Escherichia coli_{nagAC}* z genem dioksygenazy naftalenowej w celu produkcji indygo, z użyciem indolu jako induktora (73÷290 mg/dm³). W ciągu 132 d zaobserwowano gwałtowny wzrost zawartości błękitu indygowego w osadzie inokulowanym do 99,5 mg/dm³. W tym samym czasie ilość barwnika w osadzie kontrolnym oraz bioaugmentowanym szczepem *E. coli_{nagAC}* wynosiła odpowiednio 19,2 mg/dm³ oraz 27,3 mg/dm³. Przyczyną słabej produkcji indygo w osadzie wzbogaconym rekombinantem było stopniowe zamieranie tej bakterii.

Metoda bioaugmentacji znalazła również zastosowanie w kontroli zjawiska biologicznego blokowania membran filtracyjnych (biofouling), będących jednym z elementów membranowych systemów oczyszczania ścieków. Na podstawie pomiarów ciśnienia transmembranowego oraz oceny stopnia blokowania membran stwierdzono, że bioaugmentacja osadu autochtonicznym szczepem *Rhodococcus* sp. BH4 (wykazującym zdolności inhibitoryjne – quorum quenching) oraz rekombinowanym szczepem *Escherichia coli_{aiiA}* syntezującym laktonazę AHL (lakton homoseryny), przyczyniła się do wydłużenia czasu biologicznego zarastania membran – po 60 h od introdukcji badanych mikroorganizmów do osadu czynnego wartość ciśnienia transmembranowego w reaktorze bioaugmentowanym szczepami *E. coli_{aiiA}* oraz *Rhodococcus* sp. BH4 była mniejsza, odpowiednio o 38% i 50%, w porównaniu do reaktora z osadem niebioaugmentowanym. Ponadto obecność tych bakterii miała znaczący wpływ na ograniczenie zjawiska biologicznego blokowania membran przez 80 d działania reaktora membranowego [77].

Podsumowanie

Bioaugmentacja jest obiecującą technologią w eliminacji zanieczyszczeń na różnych etapach biologicznego oczyszczania ścieków. O jej skuteczności decyduje przede wszystkim dobór odpowiednich mikroorganizmów do inokulacji, charakteryzujących się zdolnością do agregacji i adhezji, produkcji substancji polisacharydowych, tworzenia biofilmu, syntezy bioflokulantów oraz synergicznie oddziałujących z mikroorganizmami autochtonicznymi. Ograniczeniami tej metody są natomiast słaba przeżywalność inokulantów lub zanik ich aktywności po wprowadzeniu do nowego dla nich środowiska. Duże nadzieje wiąże się obecnie z opracowaniem nowych metod dostarczania komórek do osadu czynnego z użyciem nanomateriałów, perspektywami wykorzystania nanorurek węglowych jako materiałów adsorbujących związki toksyczne oraz wykorzystaniem wiedzy z zakresu modulacji zjawiska sygnalizacji stopnia zagęszczenia bakterii (quorum sensing) prowadzącego do tworzenia biofilmu. Konieczne jest również monitorowanie losów inokulantów z wykorzystaniem nowoczesnych metod molekularnych, ponieważ wiedza w tym zakresie jest wciąż ograniczona. Kolejnym wyzwaniem jest kontynuowanie badań nad bioaugmentacją w pełnej skali technicznej, gdyż warunki laboratoryjne nie odzwierciedlają rzeczywistych warunków panujących w reaktorach biologicznych stosowanych w oczyszczalniach ścieków.

Artykuł powstał w wyniku realizacji projektu badawczego nr 2016/23/N/NZ9/00158 sfinansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

LITERATURA

1. N. SINGHAL, O. PEREZ-GARCIA: Degrading organic micropollutants: The next challenge in the evolution of biological wastewater treatment processes. *Frontiers in Environmental Science* 2016, Vol. 4, pp. 1–5.
2. K.F. CHASIB: Extraction of phenolic pollutants (phenol and *p*-chlorophenol) from industrial wastewater. *Journal of Chemical Engineering Data* 2013, Vol. 56, No. 6, pp. 1549–1564.
3. V. ALMAGUER-CANTÚ, L.H. MORALES-RAMOS, I. BALDERAS-RENTERÍA: Biosorption of lead(II) and cadmium(II) using *Escherichia coli* genetically engineered with mice metallothionein I. *Water Science and Technology* 2011, Vol. 68, No. 8, pp. 1607–1613.
4. S. MORLING, N. ÅSTRAND, A. N. LINDAR: Biological removal of nitrogen compounds at a coke-oven effluent stream. *Journal of Water Resource and Protection* 2012, Vol. 4, pp. 400–406.
5. A. AGRAWAL, R. S. PANDEY, B. SHARMA: Water pollution with special reference to pesticide contamination in India. *Journal of Water Resource and Protection* 2010, Vol. 2, No. 5, pp. 432–448.
6. C. MIEGE, J.M. CHOUBERT, L. RIBEIRO, M. EUSÈBE, M. COQUERY: Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – conception of a database and first results. *Environmental Pollution* 2009, Vol. 157, pp. 1721–1726.
7. A.M. SAUNDERS, M. ALBERTSEN, J. VOLLERTSEN, P.H. NIELSEN: The activated sludge ecosystem contains a core community of abundant organisms. *ISME Journal* 2016, Vol. 10, No. 1, pp. 11–20.
8. M. HERRERO, D.C. STUCKEY: Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: A review. *Chemosphere* 2015, Vol. 140, pp. 119–128.
9. M. CARBALLA, G. FINK, F. OMIL, J. LEMA, T. TERNES: Determination of the solid-water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals, estrogens and musk fragrances in digested sludge. *Water Research* 2008, Vol. 42, No. 1–2, pp. 287–295.
10. W. FU, H. FU, K. SKØTT, M. YANG: Modeling the spill in the Songhua River after the explosion in the petrochemical plant in Jilin. *Environmental Science and Pollution Research* 2008, Vol. 15, No. 3, pp. 178–181.
11. B. CAI, L. XIE, D. YANG, J.P. ARCANGELI: Toxicity evaluation and prediction of toxic chemicals on activated sludge system. *Journal of Hazardous Materials* 2010, Vol. 177, No. 1–3, pp. 414–419.
12. M.H. GERARDI: Wastewater Bioaugmentation and Biostimulation. DEStech Publications, Lancaster 2016.
13. J. ZHOU, Y. XU, Y. QU, L. TAN: Decolorization of Brilliant Scarlet GR enhanced by bioaugmentation and redox mediators under high-salt conditions. *Bioresource Technology* 2010, Vol. 101, No. 2, pp. 586–591.
14. V.M. MONSALVO, M. TOBAJAS, A.F. MOHEDANO, J.J. RODRIGUEZ: Intensification of sequencing batch reactors by cometabolism and bioaugmentation with *Pseudomonas putida* for the biodegradation of 4-chlorophenol. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2012, Vol. 87, No. 9, pp. 1270–1275.
15. E. XENOFONTOS, A.M. TANASE, I. STOICA, I. VYRIDES: Newly isolated alkalophilic *Advenella* species bioaugmented in activated sludge for high *p*-cresol removal. *New Biotechnology* 2016, Vol. 33, No. 2, pp. 305–310.

16. S. BATHE, N. SCHWARZENBECK, M. HAUSNER: Bioaugmentation of activated sludge towards 3-chloroaniline removal with a mixed bacterial population carrying a degradative plasmid. *Bioresource Technology* 2009, Vol. 100, No. 12, pp. 2902–2909.
17. F.-B. YU, S.W. ALI, L.-B. GUAN, S.-P. LI, S. ZHOU: Bioaugmentation of a sequencing batch reactor with *Pseudomonas putida* ONBA-17, and its impact on reactor bacterial communities. *Journal of Hazardous Materials* 2010, Vol. 176, No. 1–3, pp. 20–26.
18. S. H. LEE, K. OTAWA, M. ONUKI, H. SATHOH, T. MINO: Population dynamics of phage-host system of *Microlophus phosphovorus* indigenous in activated sludge. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2007, Vol. 17, No. 10, pp. 1704–1707.
19. J. J. BARR, F. R. SLATER, T. FUKUSHIMA, P. L. BOND: Evidence for bacteriophage activity causing community and performance changes in a phosphorus-removal activated sludge. *FEMS Microbiology Ecology* 2010, Vol. 74, No. 3, pp. 631–642.
20. H. F. STROO, A. LEESON, C. H. WARD: Bioaugmentation for Groundwater Remediation. Springer Science and Business Media, New York 2013.
21. M. CIRJA, G. HOMMES, P. IVASHECHKIN, J. PRELL, A. SCHÄFFER, P. F. CORVINI, M. LENZ: Impact of bioaugmentation with *Sphingomonas* sp. strain TTNP3 in membrane bioreactors degrading nonylphenol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2009, Vol. 84, No. 1, pp. 183–189.
22. S. C. S. MARTINS, C. M. MARTINS, L. M. C. G. FIÚZA, S. T. SANTAELLA: Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. *African Journal of Biotechnology* 2013, Vol. 12, No. 28, pp. 4412–4418.
23. F.-Y. HSU, Z.-Y. WANG, B.-V. CHANG: Use of microcapsules with electrostatically immobilized bacterial cells or enzyme extract to remove nonylphenol in wastewater sludge. *Chemosphere* 2013, Vol. 91, No. 6, pp. 745–750.
24. J. SIPMA, M. BEGOÑA OSUNA, M. A. E. EMANUELSOON, P. M. L. CASTRO: Biotreatment of industrial wastewaters under transient-state conditions: Process stability with fluctuations of organic load, substrates, toxicants, and environmental parameters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 2010, Vol. 40, No. 2, pp. 147–197.
25. T. R. DEVLIN, A. di BIASE, M. KOWALSKI, J. A. OLESZKIEWICZ: Granulation of activated sludge under low hydrodynamic shear and different wastewater characteristics. *Bioresource Technology* 2017, Vol. 224, pp. 229–235.
26. Y. MIAO, R. LIAO, X. ZHANG, B. LIU, Y. LI, B. WU, A. LI: Metagenomic insights into salinity effect on diversity and abundance of denitrifying bacteria and genes in an expanded granular sludge bed reactor treating high-nitrate wastewater. *Chemical Engineering Journal* 2015, Vol. 277, pp. 116–123.
27. A. BARTROLÍ, J. CARRERA, J. PÉREZ: Bioaugmentation as a tool for improving the start-up and stability of a pilot-scale partial nitrification biofilm airlift reactor. *Bioresource Technology* 2011, Vol. 102, No. 6, pp. 4370–4375.
28. Z. F. QIU, Q. ZHOU, D. H. YANG, F. T. LI: Startup and commissioning of A2/O municipal wastewater treatment plant. *Water and Wastewater Engineering* 2005, Vol. 31, No. 9, pp. 30–33.
29. Z. DYMACZEWSKI [red.]: Poradnik eksploatatora oczyszczalni ścieków. PZITS Oddział Wielkopolski, Poznań 2011.
30. J. Q. JIANG, D. H. YANG, Q. ZHOU: Natural cultivation and acclimation of activated sludge of municipal wastewater at lower temperature and concentration. *Journal of University of Science and Technology of Suzhou* 2005, Vol. 18, No. 1, pp. 1–4.
31. J. GUO, J. WANG, D. CUI, L. WANG, F. MA, C.-C. CHANG, J. YANG: Application of bioaugmentation in the rapid start-up and stable operation of biological processes for municipal wastewater treatment at low temperatures. *Bioresource Technology* 2010, Vol. 101, No. 17, pp. 6622–6629.
32. R. SARASWATHI, M. K. SASEETHARAN: Effects of temperature and pH on floc stability and biodegradation in paper. *Journal of Engineering Research and Studies* 2010, Vol. 1, No. 2, pp. 166–176.
33. N. M. CHONG, S. L. PAI, C. H. CHEN: Bioaugmentation of an activated sludge receiving pH shock loadings. *Bioresource Technology* 1997, Vol. 59, No. 2–3, pp. 235–240.
34. Y. QU, R. ZHANG, Q. MA, J. ZHOU, B. YAN: Bioaugmentation with a novel alkali-tolerant *Pseudomonas* strain for alkaline phenol wastewater treatment in sequencing batch reactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2011, Vol. 27, No. 8, pp. 1919–1926.
35. Z. YU, W. W. MOHN: Bioaugmentation with the resin acid-degrading bacterium *Zoogloea resiniphila* DhA-35 to counteract pH stress in an aerated lagoon treating pulp and paper mill effluent. *Water Research* 2002, Vol. 36, pp. 2793–2801.
36. Q. LI, M. WANG, J. FENG, W. ZHANG, Y. WANG, Y. GU, C. SONG, S. WANG: Treatment of high-salinity chemical wastewater by indigenous bacteria – bioaugmented contact oxidation. *Bioresource Technology* 2013, Vol. 144, pp. 380–386.
37. F. KARGI, A. UYGUR: Improved nutrient removal from saline wastewater in an SBR by *Halobacter* supplemented activated sludge. *Environmental Engineering Science* 2005, Vol. 22, No. 2, pp. 170–176.
38. K. SHI, W. ZHOU, H. ZHAO, Y. ZHANG: Performance of halophilic marine bacteria inocula on nutrient removal from hypersaline wastewater in an intermittently aerated biological filter. *Bioresource Technology* 2012, Vol. 113, pp. 280–287.
39. J. LIU, Y. YU, Y. CHANG, B. LI, D. BIAN, W. YANG, H. HUO, M. HUO, S. ZHU: Enhancing quinoline and phenol removal by adding *Comamonas testosteroni* bdq06 in treatment of an accidental dye wastewater. *International Biodegradation and Biodegradation* 2016, Vol. 115, pp. 74–82.
40. D. WEN, J. ZHANG, R. XIONG, R. LIU, L. CHEN: Bioaugmentation with a pyridine-degrading bacterium in a membrane bioreactor treating pharmaceutical wastewater. *Journal of Environmental Sciences* 2013, Vol. 25, No. 11, pp. 2265–2271.
41. M. Z. WANG, G. Q. YANG, H. MIN, Z. M. LV, X. Y. JIA: Bioaugmentation with the nicotine-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. HF-1 in a sequencing batch reactor treating tobacco wastewater: degradation study and analysis of its mechanisms. *Water Research* 2009, Vol. 43, No. 17, pp. 4187–4196.
42. P. XU, W. MA, H. HAN, S. JIA, B. HOU: Isolation of a naphthalene-degrading strain from activated sludge and bioaugmentation with it in a MBR treating coal gasification wastewater. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 2015, Vol. 94, No. 3, pp. 358–364.
43. N. A. ZHOU, H. L. GOUGH: Enhanced biological trace organic contaminant removal: A lab-scale demonstration with bisphenol A-degrading bacteria *Sphingobium* sp. BiD32. *Environmental Science and Technology* 2016, Vol. 50, No. 15, pp. 8057–8066.
44. Y. Q. SUN, P. DING, P. PENG, H. YANG, L. LI: Conjugative transfer of dioxin-catabolic megaplasmids and bioaugmentation prospects of a *Rhodococcus* sp. *Environmental Science and Technology* 2017, Vol. 51, No. 11, pp. 6298–6307.
45. R. JIN, H. YANG, A. ZHANG, J. WANG, G. LIU: Bioaugmentation on decolorization of C.I. Direct Blue 71 by using genetically engineered strain *Escherichia coli* JM109 (pGEX-AZR). *Journal of Hazardous Materials* 2009, Vol. 163, No. 2–3, pp. 1123–1128.
46. W. HAILEI, L. LI, L. PING, W. LING, L. LEI, Y. JIANMING: Metagenomic insight into the bioaugmentation mechanism of *Phanerochaete chrysosporium* in an activated sludge system treating coking wastewater. *Journal of Hazardous Materials* 2017, Vol. 321, pp. 820–829.
47. P. KASZYCKI, H. KOŁOCZEK: Biodegradation of formaldehyde and its derivatives in industrial wastewater with methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* and with the

- yeast-bioaugmented activated sludge. *Biodegradation* 2002, Vol. 13, No. 2, pp. 91–99.
48. D. PARK, D. S. LEE, Y. M. KIM, J. M. PARK: Bioaugmentation of cyanide-degrading microorganisms in a full-scale cokes wastewater treatment facility. *Bioresource Technology* 2008, Vol. 99, No. 6, pp. 2092–2096.
49. X. QUAN, H. SCHI, H. LIU, P. LV, Y. QIAN: Enhancement of 2,4-dichlorophenol degradation in conventional activated sludge systems bioaugmented with mixed special culture. *Water Research* 2004, Vol. 38, No. 1, pp. 245–253.
50. Y. L. YAO, Z. M. LU, F. X. ZHU, H. MIN, C. M. BIAN: Successful bioaugmentation of an activated sludge reactor with *Rhodococcus* sp. YYL for efficient tetrahydrofuran degradation. *Journal of Hazardous Materials* 2013, Vol. 261, pp. 550–558.
51. A. DHOUB, M. ELLOUZ, F. ALOUI, S. SAYADI: Effect of bioaugmentation of activated sludge with white-rot fungi on olive mill wastewater detoxification. *Letters in Applied Microbiology* 2006, Vol. 42, No. 4, pp. 405–411.
52. H. LI, L. TAN, S. NING, M. HE: Reactor performance and microbial community dynamics during aerobic degradation and detoxification of Acid Red B with activated sludge bioaugmented by a yeast *Candida tropicalis* TL-F1 in MBR. *International Biodeterioration and Biodegradation* 2015, Vol. 104, pp. 149–156.
53. S. CHATARAJ, H. J. PUROHIT, A. SHARMA, N. B. JADEJA, D. MADAMWAR: Treatment of common effluent treatment plant wastewater in a sequential anoxic-oxic batch reactor by developed bacterial consortium VN11. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2016, Vol. 179, No. 3, pp. 514–529.
54. S. SODA, H. OTSUKI, D. INOUE, H. TSUTSUI, K. SEI, M. IKE: Transfer of antibiotic multiresistant plasmid RP4 from *Escherichia coli* to activated sludge bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2008, Vol. 106, No. 3, pp. 292–296.
55. D. CUI, A. LI, T. QIU, R. CAI, C. PANG, J. WANG, J. YANG, F. MA, N. REN: Improvement of nitrification efficiency by bioaugmentation in sequencing batch reactors at low temperature. *Frontiers of Environmental Science and Engineering* 2014, Vol. 8, No. 6, pp. 937–944.
56. J. GUO, Y. PENG, H. HUANG, S. WANG, S. GE, J. ZHANG, Z. WANG: Short- and long-term effects of temperature on partial nitrification in a sequencing batch reactor treating domestic wastewater. *Journal of Hazardous Materials* 2010, Vol. 179, pp. 471–479.
57. L.-Y. PEI, Q. WAN, Z.-F. WANG, B.-B. WANG, X.-Y. ZHANG, Y.-P. HOU: Effect of long-term bioaugmentation on nitrogen removal and microbial ecology for an A2O pilot-scale plant operated in low SRT. *Desalination and Water Treatment* 2015, Vol. 55, No. 6, pp. 1567–1574.
58. M. HENZE, M. C. M. van LOOSDRECHT, G. A. EKAMA, D. BRDJANOVIC: *Biological Wastewater Treatment. Principles, Modelling and Design.* IWA Publishing, London 2008.
59. C. TAYÁ, A. GUIASOLA, J. A. BAEZA: Assessment of a bioaugmentation strategy with polyphosphate accumulating organisms in a nitrification/denitrification sequencing batch reactor. *Bioresource Technology* 2011, Vol. 102, pp. 7678–7684.
60. M. SARGOLU: Biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor by using pure cultures. *Process Biochemistry* 2005, Vol. 40, No. 5, pp. 1599–1603.
61. H. L. TANG, Y. F. XIE, Y.-C. CHEN: Use of Bio-Amp, a commercial bio-additive for the treatment of grease trap wastewater containing fat, oil, and grease. *Bioresource Technology* 2012, Vol. 124, pp. 52–58.
62. I. MANCONI, A. CARUCCI, P. LENS: Combined removal of sulfur compounds and nitrate by autotrophic denitrification in bioaugmented activated sludge system. *Biotechnology and Bioengineering* 2007, Vol. 98, No. 3, pp. 551–560.
63. W. IKEDA-OHTSUBO, M. MIYAHARA, S.-W. KIM, T. YAMADA, M. MATSUOKA, A. WATANABE, S. FUSHINOBU, T. WAKAGI, H. SHOUN, K. MIYAUCHI, G. ENDO: Bioaugmentation of a wastewater bioreactor system with the nitrous oxide-reducing denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain TR2. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2013, Vol. 15, No. 1, pp. 37–42.
64. V. P. TALE, J. S. MAKI, D. H. ZITOMER: Bioaugmentation of overloaded anaerobic digesters restores function and archaeal community. *Water Research* 2015, Vol. 70, pp. 138–147.
65. K. L. KOVÁCS, N. ÁCS, N. KOVÁCS, R. WIRTH, G. RÁKHELY, O. STRANG, Z. HERBEL, Z. BAGI: Improvement of biogas production by bioaugmentation. *BioMed Research International* 2013, Article ID 482653, pp. 1–7.
66. I.-S. KIM, K. EKPEGHERE, S.-Y. HA, S.-H. KIM, B.-S. KIM, B. SONG, J. CHUN, J.-S. CHANG, H.-G. KIM, S.-C. KOH: An eco-friendly treatment of tannery wastewater using bioaugmentation with a novel microbial consortium. *Journal of Environmental Science and Health Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 2013, Vol. 48, No. 13, pp. 1732–1739.
67. A. A. AL-GHEETHI, R. M. MOHAMED, A. N. EFAQ, I. NORLI, A. ABD HALID, H. K. AMIR, M. O. AB KADIR: Bioaugmentation process of secondary effluents for reduction of pathogens, heavy metals and antibiotics. *Journal of Water and Health* 2016, Vol. 14, No. 5, pp. 780–795.
68. A. FAKHRU'L-RAZI, A. H. MOLLA: Enhancement of bioseparation and dewaterability of domestic wastewater sludge by fungal treated dewatered sludge. *Journal of Hazardous Materials* 2007, Vol. 147, No. 1–2, pp. 350–356.
69. G. ZHENG, Z. WANG, D. WANG, L. ZHOU: Enhancement of sludge dewaterability by sequential inoculation of filamentous fungus *Mucor circinelloides* ZG-3 and *Acidithiobacillus ferrooxidans* LX5. *Chemical Engineering Journal* 2016, Vol. 284, pp. 216–223.
70. S. B. SUBRAMANIAN, Y. SONG, R. D. TYAGI, R. Y. SURAMPALLI: SSPSD using a filamentous fungal strain *Penicillium expansum* BS30 isolated from wastewater sludge. *Journal of Environmental Engineering* 2010, Vol. 136, No. 7, pp. 719–731.
71. S. POSAVAC, T. LANDEKA DRAGIČEVIĆ, M. MARIJANA ZANOŠKI HREN: The improvement of dairy wastewater treatment efficiency by the addition of bioactivator. *Mljekarstvo* 2010, Vol. 60, No. 3, pp. 198–206.
72. A. WOLNA-MURAWKA, M. JAKUBUS, J. JORDANOWSKA: ECO TABS™ preparation action in stabilization of sewage sludge part II: Assessment of microbiological properties of sludge. *Proceedings of ECOpole* 2016, Vol. 10, No. 1, pp. 367–378.
73. H. DJEJAL, A. AMRANE: Biodegradation by bioaugmentation of dairy wastewater by fungal consortium on a bioreactor lab-scale and on a pilot-scale. *Journal of Environmental Science* 2013, Vol. 25, No. 9, pp. 1906–1912.
74. L. LOPERENA, M. D. FERRARI, V. SARAVIA, D. MURRO, C. LIMA, L. FERRANDO, A. FERNÁNDEZ, C. LARRO: Performance of a commercial inoculum for the aerobic biodegradation of a high fat content dairy wastewater. *Bioresource Technology* 2007, Vol. 98, No. 5, pp. 145–151.
75. W. HAILEI, L. LI, L. PING, L. HIU, L. GUOSHENG, Y. JIANMING: The acceleration of sludge granulation using the chlamydozoospores of *Phanerochaete* sp. HSD. *Journal of Hazardous Materials* 2011, Vol. 192, pp. 963–969.
76. Y. QU, X. ZHANG, Q. MA, J. DENG, Y. DENG, J. D. VANNOSTRAND, L. WU, Z. HE, Y. QIN, J. ZHOU, J. ZHOU: Microbial community dynamics and activity link to indigo production from indole in bioaugmented activated sludge systems. *PLoS One* 2015, Vol. 10, No. 9, pp. 1–15.
77. H.-S. OH, K.-M. YEON, C.-S. YANG, R.-S. KIM, C. H. LEE, S. Y. PARK, J. Y. HAN, J.-K. LEE: Control of membrane biofouling in MBR for wastewater treatment by quorum quenching bacteria encapsulated in microporous membrane. *Environmental Science and Technology* 2012, Vol. 46, No. 9, pp. 4877–4884.

Michalska, J., Mroziak, A. Application of Bioaugmentation in Biological Wastewater Treatment and Sludge Utilization. *Ochrona Srodowiska* 2018, Vol. 40, No. 1, pp. 35–44.

Abstract: Bioaugmentation method is an attractive solution to problems associated with exposure of many wastewater treatment plants to high load of wastewater pollutants. This strategy involves introduction to activated sludge an additional pool of bacteria or microscopic fungi of desired properties, capable of aggregation and adhesion, production of polysaccharide substances, biofilm formation, synthesis of biofloculants and synergistic interactions with indigenous microorganisms, insensitive to changes in environmental parameters and of high tolerance to toxic substances. Not only may inoculation of activated sludge with such microorganisms lead to the increased biodiversity and biomass of microorganisms living in a biological reactor, accelerate the decomposition of organic pollutants, improve the process of biogenic compounds removal, but also prevent excessive growth of filamentous bacteria, improve sedimentation properties of sludge, counteract sludge foaming and support the process of its regeneration. Currently,

great promise is held out for the development of new methods of cell delivery to the activated sludge that employ nanomaterials, prospects of using carbon nanotubes as adsorbents of toxic compounds and use of knowledge in the field of modulation of bacterial quorum sensing leading to biofilm formation. Since bioaugmentation could be employed at various stages of biological wastewater treatment, it may significantly improve the operation of wastewater treatment plants. However, this method has some limitations, related to the poor survival rates of inoculants and disappearance of their activity after being introduced into the new environment. In order to broaden our understanding of this area, it is necessary to monitor the fate and activity of inoculants using modern molecular techniques and to develop new methods of cell delivery to the active sludge ecosystem. Yet, implementation of the practices tested in the laboratory environment directly into the wastewater treatment plants remains a challenge for the future.

Keywords: Sewage treatment, activated sludge, toxic contaminants, bioaugmentation, microorganisms, bacteria, fungi, consortium.

II.3

Michalska J., Greń I., Żur J., Wasilkowski D., Mroziak A. 2019. Biological cotreatment of the Kalina pond leachate on laboratory sequencing batch reactor operation and activated sludge quality. *Water*, 11(8): 1-24

Article

Impact of the Biological Cotreatment of the Kalina Pond Leachate on Laboratory Sequencing Batch Reactor Operation and Activated Sludge Quality

Justyna Michalska *, Izabela Greń, Joanna Żur, Daniel Wasilkowski and Agnieszka Mroziak

Department of Biochemistry, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Silesia, Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, Poland

* Correspondence: jmichalska@us.edu.pl

Received: 10 July 2019; Accepted: 23 July 2019; Published: 25 July 2019



Abstract: Hauling landfill leachate to offsite urban wastewater treatment plants is a way to achieve pollutant removal. However, the implementation of biological methods for the treatment of landfill leachate can be extremely challenging. This study aims to investigate the effect of blending wastewater with 3.5% and 5.5% of the industrial leachate from the Kalina pond (KPL) on the performance of sequencing batch reactor (SBR) and capacity of activated sludge microorganisms. The results showed that the removal efficiency of the chemical oxygen demand declined in the contaminated SBR from 100% to 69% and, subsequently, to 41% after the cotreatment with 3.5% and 5.5% of the pollutant. In parallel, the activities of the dehydrogenases and nonspecific esterases declined by 58% and 39%, and 79% and 81% after 32 days of the exposure of the SBR to 3.5% and 5.5% of the leachate, respectively. Furthermore, the presence of the KPL in the sewage affected the sludge microorganisms through a reduction in their functional capacity as well as a decrease in the percentages of the marker fatty acids for different microbial groups. A multifactorial analysis of the parameters relevant for the wastewater treatment process confirmed unambiguously the negative impact of the leachate on the operation, activity, and structure of the activated sludge.

Keywords: activated sludge; functional capacity; leachate; structural diversity; toxicity

1. Introduction

Due to the improvement of socioeconomic levels resulting from rapid urbanization and industrial development, the generation of municipal and industrial wastes has increased considerably worldwide over the years. Moreover, despite the guidelines of the European Union Waste Framework Directive (2008/98/EC), landfilling still constitutes one of the most common methods of waste disposal in the middle-income countries. The major concern associated with landfilling is the generation of large amounts of leachate, which originates from the water percolated through the refuse. The leachate may contain a wide range of toxic, hazardous, and carcinogenic chemical contaminants. Moreover, its composition often varies significantly, both temporally and spatially [1]. Therefore, the arbitrary disposal of industrial and municipal waste in locations that are unprepared for landfilling may result in the uncontrolled migration of the leachate into the soil, sediments, surface water, and even groundwater.

The application of biological methods in the cotreatment of landfill leachate and domestic wastewater in urban sewage plants has become popular over the last decade [2–5]. However, there is scarce information on the impact of this combined treatment on the operation of the wastewater treatment process and, in particular, on the physiological and functional state of the activated sludge microorganisms.

Depending on their source, industrial and municipal waste are characterized by a variable composition, and may contain large quantities of organic and inorganic pollutants, such as phenols,

polycyclic aromatic hydrocarbons, chloroform, sulfur compounds, cyanides, heavy metals, chloride, humic acids, and ammonia [6,7]. It is also well documented that the pollutant composition of the leachate may be much more complex than the landfilled waste itself due to the occurrence of the compounds that are formed during the processes of waste degradation [8,9]. Therefore, the difficulties in the biological treatment of the leachate originated from municipal and industrial waste are primarily related to its chemical load and changes in the important environmental parameters (e.g., pH, temperature, or salinity) during wastewater treatment.

Currently, the activated sludge process (ASP) has become dominant in biological wastewater treatment systems. In this technology, the contaminants are utilized by various microorganisms embedded with organic and inorganic particles within the extracellular polymeric substance matrix (EPS) [10]. Despite the fact that the activated sludge during wastewater treatment is often exposed to high concentrations of diverse chemicals, including inhibitory and recalcitrant ones, its autochthonous microorganisms may not be able to use them as carbon and energy sources. As a result, the abundance and activity of indigenous bacteria decrease [11,12]. Further reduction of the microbial capacity and diversity may weaken the biological wastewater treatment, or even be the cause of its complete breakdown [13–16].

The objective of this study was to assess the impact of the KPL that are discharged into the wastewater treatment plant (WWTP) “Klimzowiec” along with the municipal effluents on the activated sludge microorganisms and the laboratory-scale SBR operation. Within the context of the combined treatment of the KPL and synthetic wastewater in activated sludge, the specific goals of this research were to (1) characterize and determine the acute toxicity of the KPL to the activated sludge microorganisms, (2) evaluate the changes in the operational parameters of the SBRs, (3) analyze the functional capacity and structural diversity of the microorganisms, (4) assess the structure of the activated sludge flocs, and (5) establish the relationships between the biological and physicochemical factors being studied. The special attention will be focused on the use of marker fatty acids to assess alterations in the structure of microbial communities under the KPL exposure because such studies have not been performed yet. The analyses that will be carried out enable any effects of the mixtures of the toxic contaminants on the activated sludge microorganisms and wastewater treatment process to be predicted in advance, and thus enable solutions that ensure the stable operation of the WWTP “Klimzowiec” and similar wastewater treatment units in the nearest future to be implemented.

2. Materials and Methods

2.1. Characteristics of the Object and Sample Collection

The Kalina pond in Świętochłowice (Upper Silesia, Poland, 50°16'49" N, 18°55'38" E) is considered to be a serious environmental problem of the Upper Silesia region and a pollution hotspot. It is highly contaminated with compounds originated from the effluents and precipitation of the waste dump of the Hajduki S.A. Chemical Plant in Chorzów. From 1888 to 1990 the increasing amount of toxic substances, including phenol and its derivatives benzene, toluene, and xylene isomers (BTEX), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), and heavy metals, has been accumulated in the dump. As a result, the basin is characterized by highly alkaline sediments that contain volatile phenols at concentrations that range from hundreds to even a couple of thousand mg/L, as well as chemical oxygen demand (COD) values of more than 10,000 mg O₂/L [17]. In addition, the Kalina pond is also constantly polluted with landfill wastes that are disposed into the basin by local inhabitants. The disposal of contaminated wastewater from the Kalina pond into the urban WWTP “Klimzowiec” in Chorzów (Upper Silesia, Poland, 50°16'42" N, 18°55'35" E) began in 1998, simultaneously with the revitalization of the basin. The mechanic-biological WWTP “Klimzowiec” is one of the largest sewage plants in Poland with a purification capacity of 5600 m³/h. It collects wastewater from an agglomeration covering the following cities; Chorzów, Świętochłowice, Katowice, and Ruda Śląska, corresponding to a total catchment area of approximately 31.7 km². The wastewater treatment is based on the activated sludge technology

in Bardenpho system and consists of pre denitrification/dephosphatation zone, three denitrification reactors and five nitrification bioreactors with three independent aeration zones.

The samples of the bottom sediments from the Kalina pond were taken according to EN ISO 5667-13:2011 [18] and EN ISO 19458:2007P [19] at a distance of 2 m from the shore and a depth of 2 m, in the major point of entry of the effluents from waste dump into the pond. The samples were collected from April to May in 2017 after the completion of the revitalization process of the Kalina pond area.

The activated sludge (AS) inoculum was obtained directly from the aeration tank of the WWTP “Klimzowiec”, transferred to sequencing batch reactors (SBRs) and acclimatized to synthetic wastewater for three weeks prior to the start of the actual experiment [20].

2.2. Physicochemical and Microbial Characteristics of the KPL

The physicochemical characteristics of the Kalina pond leachate (KPL) included the chemical oxygen demand (COD), pH, phenolic index, and concentrations of N-NH_4^+ , N-NO_3^- , and N-NO_2^- (according to the Polish standards: PN-ISO 10390:1997 [21], PN-ISO 7150:1-2002 [22], PN-ISO 6439:1994 [23], PN-C-04576-4:1994 [24], PN-82/C-04576/08 [25], PN-73/C-04576/06 [26]). The short-term biochemical oxygen demand (BOD_{st}) was assessed using the respirometry method according to Hagman and Jansen [27]. The concentration of total suspended solids (TSS) in the KPL samples was measured according to the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater [28]. The values of the parameters were compared with the Order of the Minister of Environment laying down conditions for the introduction of sewage into water bodies or soil and laying down the list of substances particularly harmful to water environments [29].

The number of the selected groups of microorganisms was assessed via the indirect enumeration (EN ISO 8199:2010 [30]). Various differential media to cultivate the total heterotrophic bacteria, coliform bacteria, filamentous bacteria, Actinomycetes, and fungi were inoculated with 100 μL of serial 10-fold dilution of the KPL in 0.85% NaCl (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}). The inoculated plates were incubated at 23 ± 2 °C for 7 or 14 days, depending on the microorganisms. Furthermore, the detection and quantification of total coliform bacteria and fecal coliforms was performed using the membrane filtration reference method using 0.45 μm pore size filters (EN ISO 9308-1:2014-12/A1:2017-04) on the Lactose TTC Agar with Tergitol 7 medium and m-Endo Agar LES medium [31]. The number of fecal coliforms was expressed as the colony-forming units (CFU) in 100 mL of the KPL, whereas the total number of heterotrophic bacteria and other detected microorganisms was expressed as the CFU in 1 mL of the leachate.

2.3. Ecotoxicity of the KPL

The noninhibitory concentration (NIC), half-maximal inhibitory concentration (EC_{50}), and minimal inhibitory concentration (MIC) values for microbial growth were estimated using GraphPad PRISM 6.05 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Microbial inoculum was cultivated in the synthetic wastewater (SW) supplemented with the KPL in a concentration range from 0 to 12.5%. The initial biomass of the activated sludge was 0.1 g/L. The synthetic wastewater (SW), which was characterized by a COD:N:P ratio of 100:10:1, was designed to mimic actual domestic wastewater discharged into the WWTP “Klimzowiec” (Table 1). After 24 h of incubation with shaking at 23 ± 2 °C, the growth of the microorganisms was measured by determining the concentration of the mixed liquor suspended solids (MLSS) in the sludge samples. The SW supplemented with the KPL in a concentration range of 0 to 12.5% without the addition of the activated sludge microorganisms was used as the negative control.

Table 1. Composition and characteristics of the synthetic wastewater.

Nutrients	Compound	g/L
Carbon source	C ₆ H ₁₂ O ₆	0.285
	CH ₃ COONa	0.690
Nitrogen source	NH ₄ Cl	0.145
Phosphorus source	KH ₂ PO ₄	0.060
	K ₂ HPO ₄	0.040
Minerals	NaCl	0.069
	CaCl ₂	0.026
	KCl	0.145
COD, mg O ₂ /L		554 ± 44
N, mg/L		61.93 ± 6.54
P, mg/L		5.90 ± 0.42
pH		7.26 ± 0.1

2.4. Experimental Set-Up and Batch Experiments

The study was conducted in an experimental model of the SBR, which was used as an alternative technology to the continuous flow process employed in the WWTP “Klimzowiec” due to its low area requirement as well as manpower for operation. The experimental set-up (Figure 1A) consisted of two activated sludge SBRs: the control SBR (SBR_C), which was fed only with the SW, and the contaminated SBR (SBR_{KPL}), which was fed with the SW and two concentrations of the KPL—3.5% of the influent for the first 32 days of the experiment (stage I) and 5.5% of the influent for the next 32 days (stage II). A lower concentration of the KPL reflected its average content in the wastewater discharged into the WWTP “Klimzowiec”, while a higher concentration of the KPL reflected its content in the effluent discharged into this sewage plant during the wet season.

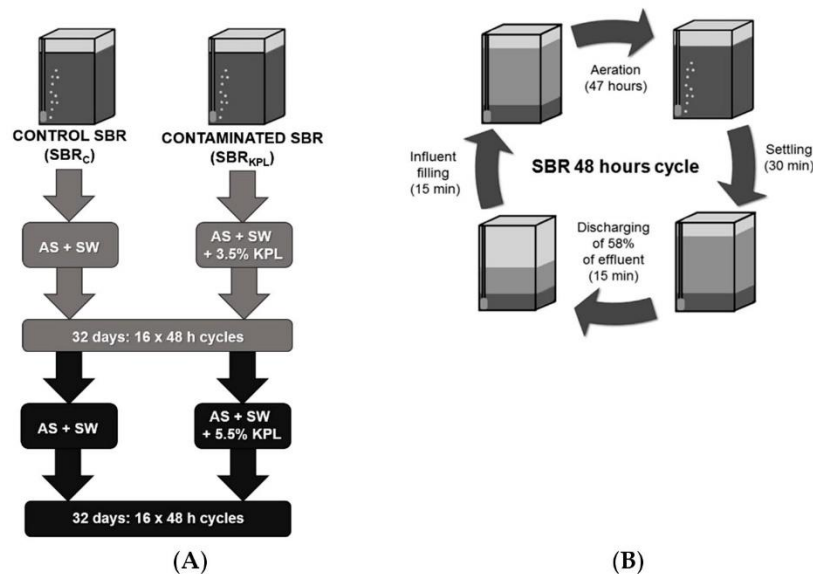


Figure 1. Scheme of experimental setup (A) and operation of the sequencing batch reactor (SBR) (B).

The AS was mixed with the wastewater in order to obtain a biomass concentration of 3 g/L to maintain the average concentration of microorganisms desired for conventional activated sludge process. An even distribution of wastewater was ensured by aeration. The dissolved oxygen (DO) level was maintained at a range as in the WWTP “Klimzowiec” (not exceeding 4 g/L) and was monitored

using an Elmetron COG-1 oxygen electrode (Elmetron®, Zabrze, Poland) [28]. The pH in the reactor chambers was not corrected during the experiment. The experiment was conducted for 64 days in order to reflect two months of the operation of the WWTP. After 32 days, and before the addition of 5.5% of the KPL, the concentration of the activated sludge biomass in the SBR_C and the SBR_{KPL} was once again brought to 3 g/L by discharging the excess sludge. The SBRs with a working volume of 9-L operated sequentially at 23 ± 2 °C within a 48-h cycle (Figure 1B), including 15 min of influent filling, 47 h of aeration, 30 min of settling, and 15 min of effluent discharging. Every second day, 58% of the effluent was removed and replaced by the same volume of the SW, with or without the addition of constant portions of the KPL in order to reflect the cycle of the wastewater treatment in the WWTP “Klimzowiec”.

2.5. Determination of the Selected Physicochemical Parameters of the AS and Microbial Counts

The COD, MLSS, mixed liquor volatile suspended solids (MLVSS), pH, and Mohlman sludge volume index (SVI) were measured in triplicate every four cycles of the SBRs operation as in reference [28].

The heterotrophic bacteria were extracted from the AS via the homogenization (20 mL aliquots on ice for 10 sec at 11,000 × g using a sterile IKA® Ultra-Turrax T-25 digital homogenizer (IKA® Works, Guangzhou, China) and enumerated according to PN-EN ISO 8199:2010 [30]. The number of bacteria was expressed as the CFU/g of the MLSS.

2.6. Enzymatic Activity of the AS

The AS activity was assayed via the quantification of selected sludge enzymes, which is routinely used to measure specific alterations in the presence of toxicants [32]. Dehydrogenases (EC.1.1.1) were used as the marker of the response of the microorganisms to environmental changes and as an indicator of the viable microorganisms in the sludge samples. Esterases (EC.3.1) are commonly used to assess the cell viability due to their direct relationship to bacterial membrane integrity. The activity of dehydrogenases (DHA) was determined according to Miksch [33], while the activity of nonspecific esterases (NSEA) was determined according to the protocol designed by Schumacher et al. [34].

2.7. Biolog® Community-Level Physiological Profiling (CLPP) of the AS and KPL

To study the functional capacity of the microorganisms in the AS and KPL, Biolog® 96-well EcoPlates™ (BIOLOG Inc., Hayward, CA, USA) were inoculated with 120 µL of the aliquot collected after microbial extraction. To determine metabolic response for a comparable number of microorganisms, the aliquots obtained from the sludge and leachate were adjusted to 0.05–0.01 absorbance units (at λ = 590 nm) in order to avoid the dark brown color generated from the samples and to standardize the size of the inoculum at a level of 10⁸ CFU/mL. The microplates were incubated at 23 ± 2 °C in the dark. The absorbance in each well was measured at 590 nm using a Biolog® Microstation™ immediately after the inoculation of the plates, and then every 12 h until the value curve plateau of the average well color development (AWCD) or inflection point was reached. The data were collected using Microlog 4.01 software. The CLPP analysis of the KPL was performed before its addition to the bioreactor, whereas the CLPP analyses of the AS were conducted at the beginning (SBR0d), after 32 (SBR_C32d and SBR_{KPL}32d), and 64 days (SBR_C64d and SBR_{KPL}64d) of the experiment.

The specific rate of the increase in microbial activity—A(t), which is given as a function of time for the utilization of each carbon source in EcoPlate™ [35] was fitted to the nonlinear model described by Verhulst [36] with the four-parameter logistic function given by the equation

$$A(t) = \frac{A_{\max}}{1 + be^{-kt_{50}}} \quad (1)$$

By fitting the Verhulst logistic equation to the empirical data obtained for each carbon source using the Levenberg–Marquadt algorithm implemented in the leastsq function of Python’s SciPy package [37], the following parameters were estimated; A_{\max} represents the maximum microbial activity; t_{50} indicates the time at which the microbial activity has reached half of its maximum and k , which is related to the steepness slope of $A(t)$ at $t = t_{50}$; and b is the relative microbial activity increase in an arbitrary constant [35,38,39]. In this study, the time at which the total microbial activity increased at the fastest rate (Avt_{50}) was determined separately for each sample and used to compare the samples from the different activated sludge treatments by calculating the functional capacity indices: average well color development (AWCD), metabolic richness index (S), Gini coefficient (G), and Shannon–Weaver diversity index (H'_{ECO}) [40,41]. The Avt_{50} was calculated as follows

$$Avt_{50} = \frac{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\ln b}{k} \right)}{N} \quad (2)$$

The carbon sources in an EcoPlate™ were divided into seven groups according to Nowak and Mroziak [42]. Additionally, the carbon use index (C-USE), nitrogen use index (N-USE), and phosphorus use index (P-USE) were calculated as in reference [42].

2.8. Extraction and Analysis of the Fatty Acid Methyl Esters (FAMES)

For the qualitative and quantitative analyses of the fatty acids in the AS, triplicate samples of the sludge (5 mL) were collected from the SBRs at the beginning (SBR0d), after 32 (SBR_C32d and SBR_{KPL}32d), and 64 days (SBR_C64d and SBR_{KPL}64d) of the experiment. Next, they were homogenized on ice for 10 sec at 11,000 rpm using a sterile IKA® Ultra-Turrax T-25 digital homogenizer. The biomass was pelleted via centrifugation at 4 °C, 5000× *g*, for 20 min. The fatty acids were extracted from the sludge samples according to the procedure described by Kozdroj [43] and identified using a Microbial Identification System (MIS, Microbial ID, Inc., Newark, DE, USA).

The similarity between the structures of the microbial communities, based on the FAME analysis, was calculated using Shannon–Weaver diversity index [42] and the weighted stack method [44] given by the formula

$$\text{SIM, \%} = \sum_{i=1}^n \frac{x_{ia} + x_{ib}}{2} \min \left\{ \frac{x_{ia}}{x_{ib}}, \frac{x_{ib}}{x_{ia}} \right\} \quad (3)$$

where, min is minimum, x_i is the mole % of i^{th} FAME, and the subscripts a and b are two compared activated sludge profiles.

To study the changes in the structure of microbial communities in the AS exposed to the KPL, the following FAME biomarkers were analyzed; 11:0 *iso*, 11:0 *anteiso*, 13:0 *iso*, 13:0 *anteiso*, 14:0 *iso*, 15:0 *iso*, 15:0 *anteiso*, 16:0 *iso*, 17:0 *iso*, 17:0 *anteiso* for Gram-positive bacteria (BG+) [45], 17:0 *cy*, 19:0 *cy*, 16:1 ω 5c, 16:1 ω 7c, 17:1 ω 7c, 18:1 ω 7c for Gram-negative bacteria (BG-) [45], 16:0 10Me, 17:0 10 Me, 18:0 10 Me for those of an actinomycete origin (Ac) [46], 18:1 ω 9c, 18:2 ω 6, 9c, 18:3 ω 3c, 18:3 ω 6c for fungi (F) [47], and 20:2 ω 6, 9, 20:4 ω 6, 9, 12, and 15c for protozoa (Pr) [48,49]. The sum of BG+, BG-, and Ac was selected to represent the total bacteria (TB) in the sludge samples.

2.9. Microscopic Analysis of the AS Flocc Structure

The internal structure of the activated sludge flocs was assessed in both SBRs at the end of the experiment. The visualization of the AS was carried out using a bright-field microscopy without staining and with acridine orange (AO) fluorescent staining using a Nikon Eclipse epifluorescence microscope (Nikon, Poland) with a 485 nm excitation laser and a 520 nm emission filter.

2.10. Statistical Analyses

All of the data presented in this paper were expressed as the mean and standard deviation and were analyzed using Microsoft Office Excel 2010, Statistica® 12.5 PL (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA), GraphPad Prism 5, ScyPy, and R-Studio software. For the cluster analysis, all of the data were first subjected to min–max normalization according to the equation

$$ND = \frac{RD_i - RD_{\min}}{RD_{\max} - RD_{\min}} \quad (4)$$

Where, ND (normalized data)—all of the variables scaled to the range (0, 1); RD_i —the initial raw data; RD_{\min} —the minimal value of each parameter in a data set; and RD_{\max} —the maximal value of each parameter in a data set.

The factors that might influence the changes between the SBR_C and the SBR_{KPL} during wastewater treatment were evaluated using principal component analysis (PCA) based on a Spearman correlation matrix.

The changes between the SBR_C and the SBR_{KPL} during wastewater treatment were determined using a one-way analysis of variance (ANOVA, post hoc test) and were followed by the separation of the treatments from the control, as well as among themselves, by applying the post hoc LSD at confidence intervals of 95% ($p < 0.05$). The values that are indicated by different lower case and upper case letters were statistically significant. If there are no letters, there were no statistically significant differences between the samples.

Bonferroni's test for multiple comparisons was used to study the dissimilarities between the SBR_C and the SBR_{KPL} . The differences are indicated by asterisks (Bonferroni correction, $p = ns \geq 0.05 \geq * > 0.01 \geq ** > 0.001 \geq *** > 0.001 \geq ****$) where ns, *, **, ***, and **** indicate no significant differences, significant differences, very significant differences, and extremely significant differences, respectively.

3. Results

3.1. Characteristics and Toxicity of the KPL

The KPL was a cloudy, black liquid that had a strong odor and a strongly alkaline pH (9.0). It was contaminated with organic pollutants and phenolic compounds as was indicated by its COD and phenolic index. The leachate was also characterized by moderately high concentrations of organic and inorganic matter (TSS) and a low BOD_{st} level. The most dominant source of nitrogen in the KPL was $N-NH_4$, whereas the content of $N-NO_3^-$ and $N-NO_2^-$ were relatively low. Moreover, the leachate was rich in orthophosphates and had a high pollution index (Table 2).

Table 2. Selected physicochemical parameters of the Kalina pond (KPL).

Physicochemical Parameter	Value	Values According to Reference [29]	Method/Source
pH	8.98 ± 0.01	6.50–9.00	[21]
TSS, g/L	4.87 ± 0.40	0.035	[28]
$N-NH_4^+$, mg/L	398.93 ± 21.16	10.00	[22]
$N-NO_2^-$, mg/L	0.04 ± 0.00	1.00	[23]
$N-NO_3^-$, mg/L	2.93 ± 0.25	30.00	[50]
$P-PO_4^{2-}$, mg/L	154.44 ± 15.81	2.00	[24]
COD, mg O_2 /L	2510.00 ± 21.60	250	[25]
Phenols, mg/L	185.67 ± 4.51	1.00	[26]
BOD_{st} , mg O_2 /TSS × h	12.55 ± 0.99	na	[27]
Leachate pollution index (LPI)	38.28	na	[51]

Average values of samples collected from April to May in 2017; na—data not available.

Microbial analysis of the KPL showed a high abundance of heterotrophic microorganisms, including *Actinomycetes* and filamentous bacteria. However, the overall number of microscopic fungi and Gram-negative potential pathogens in the leachate was significantly lower (Table 3).

Table 3. Selected microbiological parameters of the KPL.

Microbiological Parameter	Value	Method/Medium
Total heterotrophic bacteria, $10^6 \times$ CFU/mL	3.04 ± 0.83	[30]
Coliform bacteria, $10^4 \times$ CFU/100 mL	1.06 ± 0.79	[31]
Fecal coliform bacteria, $10^2 \times$ CFU/100 mL	6.50 ± 0.14	[31]
<i>Actinomycetes</i> , $10^6 \times$ CFU/mL	1.25 ± 0.54	Gauze's Agar
Filamentous bacteria, $10^5 \times$ CFU/mL	5.68 ± 0.04	Sabouraud Agar
Fungi, $10^3 \times$ CFU/mL	5.00 ± 3.00	Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar

Average values of samples collected from April to May in 2017.

In order to analyze the metabolic functions of the KPL microbial communities, all of the EcoPlate™ substrates were grouped according to their biochemical guild. Microorganisms in the KPL were characterized by a low functional capacity confirmed by a low value of the AWCD (0.16) and metabolic richness index of 6.00 (Table 4). They were able to use merely 20% of the carbon sources available in an EcoPlate™ and they did not utilize any of the compounds belonging to the C and A guilds or the phosphorus-containing substrates. The microbial growth mainly appeared in the presence of specific carboxylic acids. The KPL microorganisms were also able to utilize all of the surfactants available in the EcoPlate™ with a very similar efficiency of 7% and 9.26% for Tween 40 and Tween 80, respectively. Furthermore, the microbial growth was significantly supported by 4-hydroxybenzoic acid, glycogen and L-asparagine. The unequal utilization of the carbon sources by the KPL microbial communities was confirmed by the high value of the Gini coefficient ($G = 0.85$) (Table 4).

Table 4. Biolog EcoPlate indices of the KPL sample.

Indices	Value
H'_{Eco}	1.66 ± 0.23^a
S	6.00 ± 0.02^a
G	0.85 ± 0.01^a
A_{max}	0.40 ± 0.05^a
AWCD	0.16 ± 0.03^a
Avt_{50}	56.94 ± 5.45^a
C, %	0.00 ± 0.00^a
A, %	0.00 ± 0.00^a
AA, %	22.17 ± 6.85^a
CA, %	35.17 ± 20.03^a
PA, %	11.64 ± 4.72^a
S, %	16.26 ± 10.18^a
P, %	20.08 ± 1.99^a
C-USE, %	20.00 ± 3.33^a
P-USE, %	0.00 ± 0.00^a
N-USE, %	22.17 ± 6.85^a

H'_{ECO} —Shannon–Weaver diversity index; S—metabolic richness index; G—Gini coefficient; A_{max} —maximum microbial activity; AWCD—average well color development; Avt_{50} —time at which the total microbial activity increased at the fastest rate; C—carbohydrates; A—amines; AA—amino acids; CA—carboxylic acids; PA—phenolic acids; S—surfactants; P—polymers; C-USE—carbon use index; P-USE—phosphorus use index; N-USE—nitrogen use index. Different letters indicate statistically significant at $p < 0.05$ differences among means.

Because the KPL has been discharged into the wastewater stream and cotreated in the WWTP “Klimzowiec” since 1998, it was particularly interesting to evaluate the ecotoxicity of the leachate. According to the data obtained from the wastewater treatment plant “Klimzowiec”, the concentrations of the leachate in the raw wastewater depend on the seasonal weather variations and they reach

1.5% and 5.5% during the dry and rainy season, respectively. Taking this into account, a wider concentration range of 0.5 to 12.5% was used in this study. As shown in Figure 2, a negligible inhibition of microbial growth in the presence of 3.45% (NIC value) of the KPL was observed. However, a significant toxic effect was achieved in the presence of 6.69% (IC₅₀ value) of the pollutant. The exposure of the AS microorganisms to 11.26% (MIC value) of the KPL resulted in the complete inhibition of microbial growth.

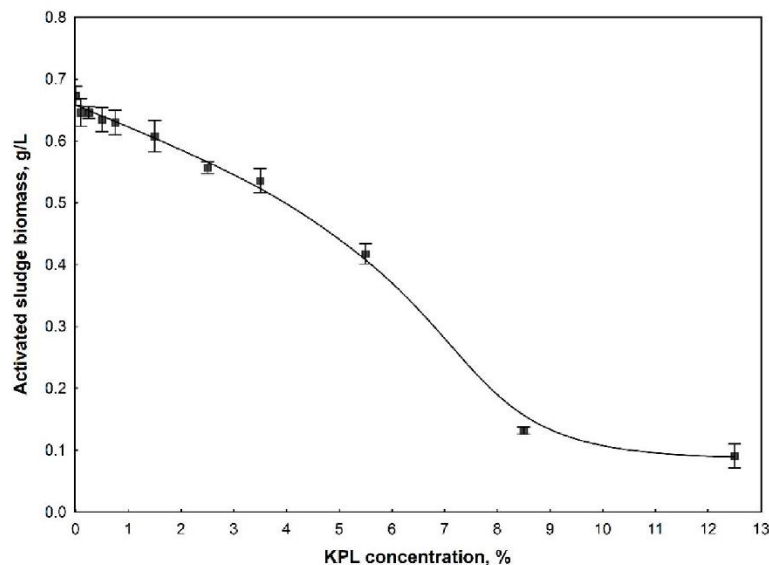


Figure 2. The growth inhibition of the activated sludge microorganisms in the presence of various concentration of the KPL. Estimated values of ecotoxicity of the leachate: NIC = 3.45 ± 0.01 , EC₅₀ = 6.69 ± 0.70 , and MIC = 11.26 ± 0.35 .

3.2. Operational Parameters of the AS Bioreactor

Because 1.5% of the KPL was below the toxicity threshold, this study focused on assessing the long-term impact of 3.5% and 5.5% of the leachate in the wastewater on operational parameters of the AS in the SBR. A comparison of performance of the SBR_C and SBR_{KPL} (Figure 3) showed that the behavior of the AS was strongly affected by the quality of the wastewater. An increase in the KPL concentration in the effluent correlated with a gradual reduction in the removal efficiency of the chemical oxygen demand (COD_r) in the SBR_{KPL}. After 32 days of cotreatment with 3.5% of the KPL, the COD_r decreased by 27%. However, a much more significant decline of this parameter by 57% occurred in the bioreactor after the combined treatment with 5.5% of the leachate. By comparison, the SBR_C was characterized by a high level of the efficiency of wastewater treatment within a range of 83 to 96% (Figure 3A). The next crucial parameter used in the WWTP operation is the sludge volume index (SVI) that reflects the conditions of the sludge. The addition of the KPL into the sewage resulted in a significant reduction in the SVI value (Figure 3B) from 143 mL/g to 77 and 53 mL/g at the end of both stages of the wastewater treatment, respectively. In contrast, the SVI in the SBR_C was fairly constant with no significant fluctuations in its value from 143 to 102 mL/g. Moreover, the pH value affected the rates and limited microbial growth in the AS and a gradual increase in this parameter from 7.6 to 8.1, and 8.1 to 9.3, was observed in the SBR_{KPL} during both stages of the wastewater treatment, respectively (Figure 3C). Conversely, no significant changes in the pH value were found in the SBR_C. Variations in the MLVSS to MLSS ratio (Figure 3D) denoted a change in the AS biomass. In this study, a slight increase in the MLVSS ratio from 0.83 to 0.98 was observed during the first 32 days of wastewater treatment in the SBR_C and subsequently from 0.81 to 0.91 during the next 32 days. Conversely, the

MLVSS/MLSS ratio in the AS polluted with 3.5% of the KPL was fairly constant (0.83–0.85). The increase in the leachate concentration to 5.5% resulted in a significant decrease of this parameter to 0.69.

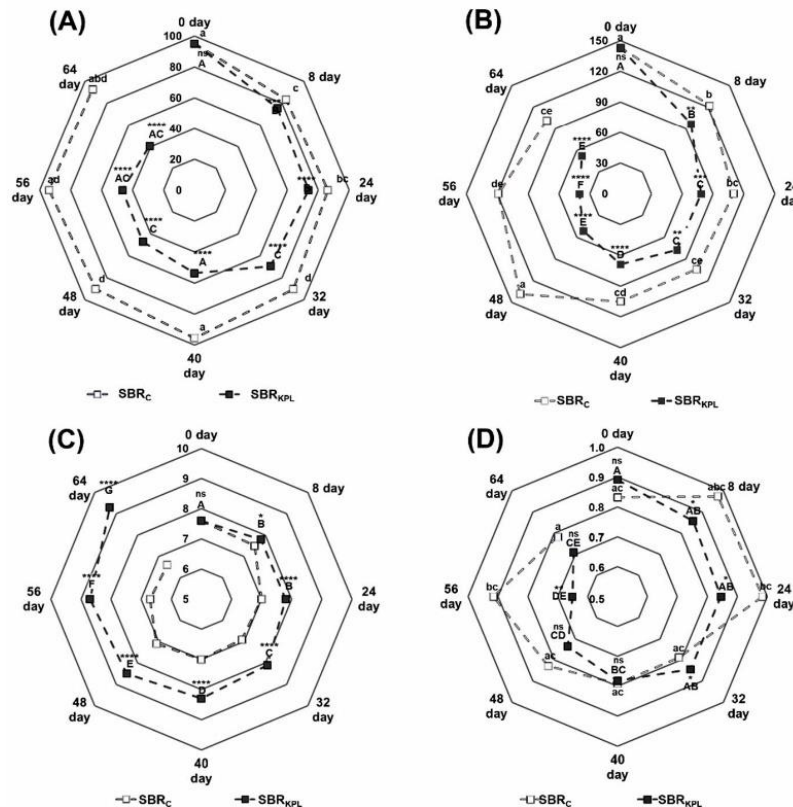


Figure 3. The changes in removal efficiency of chemical oxygen demand (COD_r) (A), sludge volume index (SVI) (B), pH value (C), and the ratio of MLVSS/MLSS (D) in the SBR_c and SBR_{KPL} during 64 days of wastewater treatment.

3.3. Number of Heterotrophic Bacteria and Microbial Activity of the AS

An analysis of the total number of sludge heterotrophic bacteria (THB) indicated a slight decrease by 4% and 8% in the SBR_c and SBR_{KPL} after 8 days of the experiment, respectively (Figure 4). However, during the next 16 days, a further decrease in the THB count by 7% was observed in the SBR_{KPL} treated with 3.5% of the KPL. At the same time, the THB count in the SBR_c was similar to its initial value. The MLSS and MLVSS were used to determine the total mass and biomass in the SBR, respectively (Figure 4). A significant decrease in the MLVSS by 39% in the SBR_{KPL} was found after 48 days of the KPL cotreatment, which correlated with a decrease in the THB number by 28%. After day 48, neither the MLVSS nor THB count in the polluted AS showed any further variations. By contrast, a gradual and significant increase in the MLVSS content by 38% was observed in the SBR_c, while the THB number remained unchanged in this system. It was found that bioreactors varied significantly in respect to the noncellular suspended matter in the AS (Figure 4). In the SBR_{KPL}, a gradual increase in the suspended matter by 92% was observed at the end of stage II of the wastewater treatment. By contrast, a decrease in this parameter in the SBR_c by 91% and 31% was found at the beginning of both stages of the wastewater treatment, respectively.

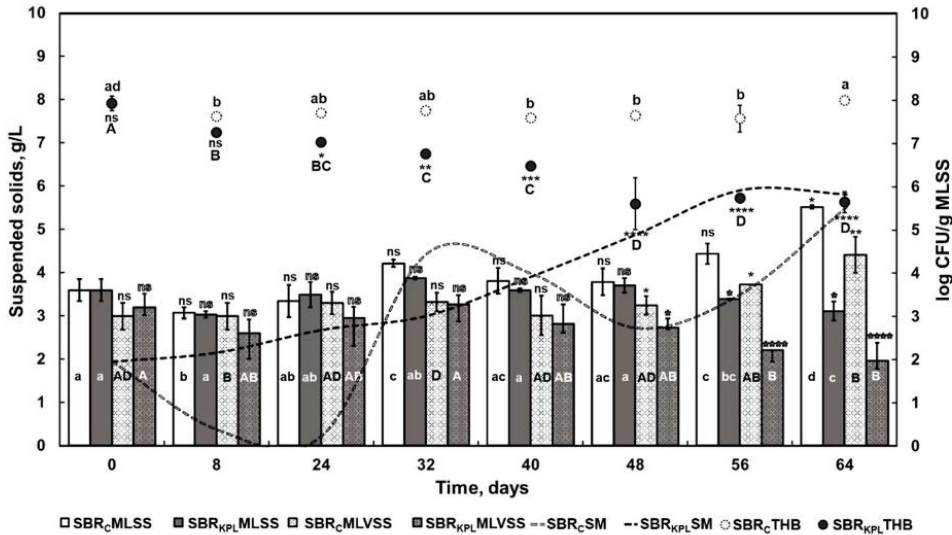


Figure 4. The changes in the MLSS, MLVSS, suspended matter (SM), and number of heterotrophic bacteria (THB) in the SBR_c and SBR_{KPL} during 64 days of wastewater treatment.

The presence of the KPL in the wastewater extremely affected the activity of the dehydrogenases (DHA) (Figure 5A) and nonspecific esterases (NSEA) in the AS (Figure 5B). During the first 24 days of the wastewater treatment, a significant decrease in the DHA by 12% and in the NSEA by 20% was found in the SBR_c. Subsequently, the respiratory activity began to increase and after reaching its initial value, it remained at a similar level in the control AS. By comparison, there was a sharp decrease in the NSEA and DHA by 51% and 40% in the SBR contaminated with 3.5% of the leachate, respectively. Moreover, the increase in the pollutant concentration in the wastewater stream from 3.5 to 5.5% resulted in a further decrease in the DHA by 70% and in the NSEA by 33%.

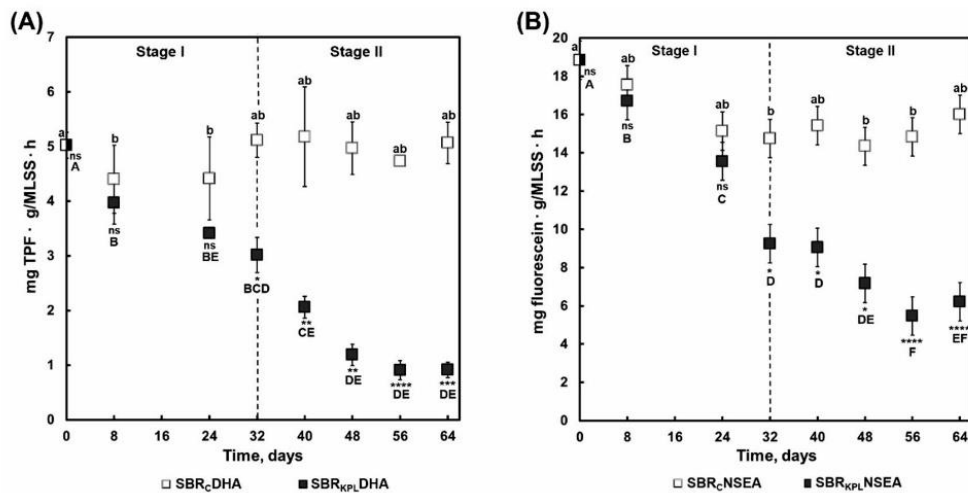


Figure 5. The changes in activity of dehydrogenases (A) and nonspecific esterases (B) in the SBR_c and SBR_{KPL} during 64 days of wastewater treatment.

To compare the microbial activity of the unpolluted and contaminated AS in the SBRs, the EcoPlate™ indices were calculated (Table 5). It was found that the discharge of 3.5% of the KPL into the wastewater stream resulted in a sharp decrease from 27.67 to 19.33 in the metabolic richness index (S) for the sludge microbial communities.

Table 5. Values of functional capacity indices; kinetic parameters— A_{max} ; A_{vt50} ; and usage of carbon substrate guilds for the untreated AS and treated with KPL.

Treatment	SBR0d	SBR _C 32d	SBR _C 64d	SBR _{KPL} 32d	SBR _{KPL} 64d
H'_{ECO}	3.15 ± 0.12 ^b	2.99 ± 0.16 ^b	3.33 ± 0.15 ^b	2.82 ± 0.15 ^b	2.11 ± 0.15 ^c
S	27.67 ± 1.53 ^b	24.67 ± 2.08 ^b	29.00 ± 1.41 ^b	19.33 ± 1.53 ^c	10.67 ± 0.58 ^d
G	0.36 ± 0.02 ^b	0.51 ± 0.02 ^c	0.43 ± 0.08 ^d	0.58 ± 0.02 ^e	0.79 ± 0.02 ^f
A_{max}	1.38 ± 0.02 ^b	1.65 ± 0.64 ^c	1.35 ± 0.22 ^b	1.07 ± 0.06 ^d	0.70 ± 0.04 ^e
AWCD	0.85 ± 0.04 ^b	0.98 ± 0.05 ^c	0.96 ± 0.12 ^{b,c}	0.58 ± 0.04 ^d	0.24 ± 0.04 ^a
A_{vt50}	41.35 ± 1.23 ^b	52.05 ± 0.90 ^c	41.95 ± 3.27 ^b	55.06 ± 1.51 ^{a,c}	39.82 ± 2.07 ^b
C, %	38.92 ± 1.50 ^b	25.45 ± 1.78 ^c	29.52 ± 2.30 ^c	28.61 ± 1.41 ^c	39.27 ± 4.82 ^b
A, %	5.66 ± 0.24 ^b	15.68 ± 2.74 ^c	8.81 ± 3.36 ^{b,d}	14.93 ± 1.72 ^c	10.14 ± 2.67 ^d
AA, %	15.66 ± 1.70 ^b	23.80 ± 0.51 ^a	20.49 ± 1.64 ^a	23.04 ± 2.30 ^a	24.71 ± 1.72 ^a
CA, %	17.92 ± 1.99 ^b	16.59 ± 1.63 ^b	19.41 ± 2.54 ^b	18.20 ± 3.00 ^b	7.83 ± 3.71 ^c
PA, %	3.57 ± 0.88 ^b	5.90 ± 0.52 ^c	6.57 ± 1.48 ^c	6.45 ± 1.48 ^c	11.04 ± 0.24 ^a
S, %	6.43 ± 0.52 ^b	5.84 ± 1.79 ^b	7.33 ± 0.12 ^b	3.08 ± 0.12 ^b	4.61 ± 0.31 ^b
P, %	11.84 ± 0.40 ^b	6.75 ± 0.28 ^c	7.52 ± 1.16 ^c	6.19 ± 2.09 ^{c,d}	4.02 ± 0.00 ^d
C-USE, %	92.22 ± 5.09 ^a	82.22 ± 6.94 ^b	88.89 ± 13.88 ^b	64.44 ± 5.09 ^c	35.52 ± 1.92 ^d
P-USE, %	4.82 ± 0.37 ^b	2.03 ± 0.07 ^b	1.25 ± 0.62 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
N-USE, %	29.47 ± 1.75 ^a	45.72 ± 3.25 ^b	38.82 ± 0.98 ^c	45.34 ± 3.10 ^b	47.06 ± 2.82 ^b

H'_{ECO} —Shannon–Weaver diversity index; S—metabolic richness index; G—Gini coefficient; A_{max} —maximum microbial activity; AWCD—average well color development; A_{vt50} —time at which the total microbial activity increased at the fastest rate; C—carbohydrates; A—amines; AA—amino acids; CA—carboxylic acids; PA—phenolic acids; S—surfactants; P—polymers; C-USE—carbon use index; P-USE—phosphorus use index; N-USE—nitrogen use index. Different letters indicate statistically significant at $p < 0.05$ differences among means.

An increase in the KPL concentration in the wastewater from 3.5 to 5.5% resulted in a decrease in the value of AWCD and metabolic richness to 0.24 and 10.67, respectively. Consistently, the microorganisms that had not been exposed to the leachate were characterized by a significant AWCD of 0.96 and a high metabolic richness of 29. Although the activity (AWCD) of the AS microorganisms in the SBR_{KPL} was lower than in the SBR_C, the microbial communities in both bioreactors achieved half of their overall maximal activity at the same time (t_{50}) (Figure 6). In the SBR_{KPL}, the microorganisms were able to utilize 64.44% of the carbon sources, whereas in the SBR_C, the bacteria metabolized 82.22% of the EcoPlate™ substrates, which correlated with a metabolic richness index of 19.33 and 24.67, respectively. It was found that the long-term presence of the KPL in the wastewater significantly affected the relative abundance of the AS microorganisms, which was reflected by the almost 2-fold higher value of the Gini coefficient compared to the control sludge. The results of the H'_{ECO} showed a decrease in the functional capacity of the microorganisms in the SBR_{KPL} from 3.15 to 2.11 after 64 days of the KPL treatment. The H'_{ECO} calculated for the SBR_C was roughly stable (2.99 to 3.33).

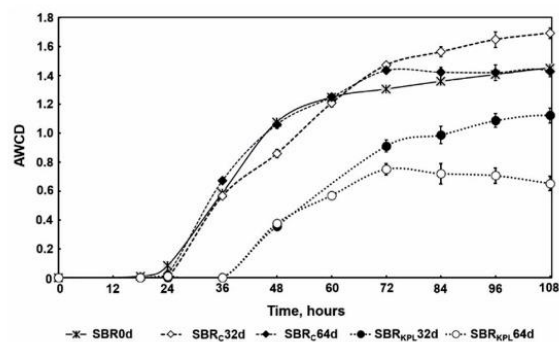


Figure 6. Comparison of average well color development (AWCD) of metabolized substrates in Biolog® EcoPlate™ (Biolog, Inc., Hayward, CA, USA) by the AS microorganisms at the beginning (0d) and after 32 and 64 days of wastewater treatment in the SBR_C and SBR_{KPL}.

In order to determine whether the type of activated sludge treatment affects the substrate utilization patterns of AS microorganisms, a similar analysis as for the KPL was performed. Compared to the SBR_C, the presence of the KPL in the wastewater primarily affected the utilization efficiency of C and PA by 13% and 11%, and 25% and 68% after the cotreatment with 3.5% and 5.5% of the leachate, respectively. A higher concentration of the KPL primarily affected the CA, S and P utilization patterns, which was reflected by a decrease in the intensity of their usage from 19.41 to 7.83%, 7.33 to 4.61%, and 7.52 to 4.02%, respectively. The N-USE and P-USE indices were used to compare the microbial communities from the SBR_C and SBR_{KPL} in regard to their ability to utilize the nitrogen and phosphorus sources. It was shown that the microorganisms in the contaminated AS achieved a 23% higher N-USE index than the microorganisms that had not been exposed to the pollutant. Although the utilization of the phosphorus-containing compounds decreased in the SBR_C over time, the microorganisms in the SBR_{KPL} did not utilize any of the available phosphorus sources even after treatment with 3.5% of the leachate.

3.4. Structural Diversity of the Microbial Communities in the AS

Literature data indicates that the fatty acid patterns can be used to assess changes in the AS microbial communities when the WWTP is operated in a specific way [52]. Here, the participation of the FAME markers for BG⁻ was the highest in both investigated SBRs (Table 6). However, their content in the contaminated AS gradually decreased from 33.2 to 18.56%, along with an increase in the concentration of the pollutant in the wastewater. Similarly, a decrease in the content of the F and Pr biomarkers in the SBR_{KPL} from 7.49 to 2.95% and from 2.14 to 0.82% was confirmed, respectively. Over the 64 days, the contribution of the BG⁻, F, and Pr markers did not change in the SBR_C where they constituted 29.64%, 6.82%, and 2.21%, respectively. The content of the FAME markers for BG⁺ and Ac increased over time in the SBR_{KPL} from 5.97% and 0.30% to 12.27% and 2.79%, respectively, and significantly surpassed their values in the SBR_C (5.90 and 0.31%). The increase in the content of BG⁺ markers in the contaminated AS correlated with the increase in the BG⁺/BG⁻ ratio from 0.19 to 0.66. The fluctuations in the participation of the tested microbial groups in the contaminated AS resulted in a gradual decrease in its structural diversity as was indicated by an increase in the H'_{FAME} index from 2.83 to 2.68 and 2.56 after 32 and 64 days of the treatment, respectively. Conversely, the structure of the microbial communities in the SBR_C did not change significantly during the experiment. The impact of the KPL on the AS communities was reflected in an increase in the sat/unsat ratio from 0.89 to 1.73 and in the anteiso/iso ratio from 0.70 to 1.43, which also correlated with an increase in the abundance of the fatty acid precursors from 0.01 to 0.46 (Table 6).

Table 6. The percentages of distinct FAME markers, H', sat/unsat, anteiso/iso, and cy/pre ratio for the untreated AS and treated with the KPL.

Treatment	SBR0d	SBR _C 32d	SBR _C 64d	SBR _{KPL} 32d	SBR _{KPL} 64d
TB	37.99 ± 0.00 ^a	37.09 ± 2.12 ^a	35.53 ± 0.52 ^a	26.14 ± 0.94 ^b	30.83 ± 0.47 ^b
BG ⁻	33.20 ± 0.00 ^a	31.33 ± 2.11 ^{a,b}	29.64 ± 0.94 ^b	20.00 ± 0.74 ^c	18.56 ± 0.11 ^c
BG ⁺	5.97 ± 0.00 ^a	5.75 ± 0.01 ^a	5.90 ± 0.42 ^a	5.94 ± 0.21 ^a	12.27 ± 0.58 ^b
Ac	0.30 ± 0.00 ^a	0.24 ± 0.01 ^a	0.31 ± 0.02 ^a	2.42 ± 0.25 ^b	2.79 ± 0.04 ^b
F	7.49 ± 0.00 ^a	7.19 ± 1.32 ^a	6.82 ± 0.34 ^a	3.94 ± 0.04 ^b	2.95 ± 0.43 ^b
Pr	2.14 ± 0.00 ^a	1.98 ± 0.10 ^a	2.21 ± 0.17 ^a	1.09 ± 0.05 ^b	0.82 ± 0.09 ^b
BG ⁺ /BG ⁻	0.19 ± 0.00 ^a	0.18 ± 0.01 ^a	0.20 ± 0.02 ^a	0.27 ± 0.00 ^b	0.66 ± 0.04 ^b
F/TB	0.19 ± 0.00 ^a	0.19 ± 0.03 ^{a,b}	0.19 ± 0.02 ^{ab}	0.16 ± 0.01 ^b	0.09 ± 0.01 ^c
H' _{FAME}	2.83 ± 0.00 ^a	2.91 ± 0.05 ^a	2.85 ± 0.02 ^a	2.68 ± 0.14 ^b	2.56 ± 0.00 ^c
sat/unsat	0.89 ± 0.00 ^a	0.85 ± 0.05 ^a	0.84 ± 0.08 ^a	1.46 ± 0.07 ^b	1.73 ± 0.03 ^b
anteiso/iso	0.70 ± 0.00 ^a	0.71 ± 0.09 ^a	0.39 ± 0.03 ^b	0.89 ± 0.20 ^c	1.43 ± 0.10 ^d
cy/pre	0.01 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.01 ± 0.00 ^a	0.25 ± 0.00 ^b	0.46 ± 0.03 ^b

TB—total bacteria; BG⁻—Gram-negative bacteria; BG⁺—Gram-positive bacteria; Ac—*Actinomyces*; F—fungi; Pr—protozoa; H'_{FAME}—Shannon–Weaver diversity index; sat—saturated fatty acids; unsat—unsaturated fatty acids; anteiso—anteiso-branched saturated fatty acids; iso—iso-branched saturated fatty acids; cy—cyclopropane fatty acids; pre—saturated fatty acid precursors. Different letters indicate statistically significant at $p < 0.05$ differences among means.

An analysis of the distinct fatty acid groups indicated that the FAMES were significantly affected by the type of AS treatment (Figure 7A). It was found that in the SBR_{KPL} , the yield of hydroxylated and cyclopropane fatty acids increased almost 2-fold and 22-fold during stage I of the wastewater treatment, respectively. Moreover, after the exposure of the AS to the effluents loaded with 5.5% of the KPL, a further increase in the abundance of the cyclopropane fatty acids from 5.70 to 7.44% was observed. Simultaneously, an increase in the branched fatty acid content by 57% and a decrease in the straight chain and saturated fatty acid participation by 9% and 32% were observed, respectively. Conversely, the FAME profiles obtained for the uncontaminated AS did not undergo any significant changes over the experimental period. The similarity between the structures of the microbial communities in the SBR_C and the SBR_{KPL} , based on the FAME analysis, showed that the AS microorganisms changed in both types of operating conditions (Figure 7B). However, the most significant variations in the sludge operation were observed in the SBR_{KPL} , where the value of the similarity coefficient (SIM) decreased by 36% and 45% after 32 and 64 days of the KPL treatment, respectively, compared to its value at the beginning of the experiment. Simultaneously, the SIM was 86% and 73% for the SBR_C at that time.

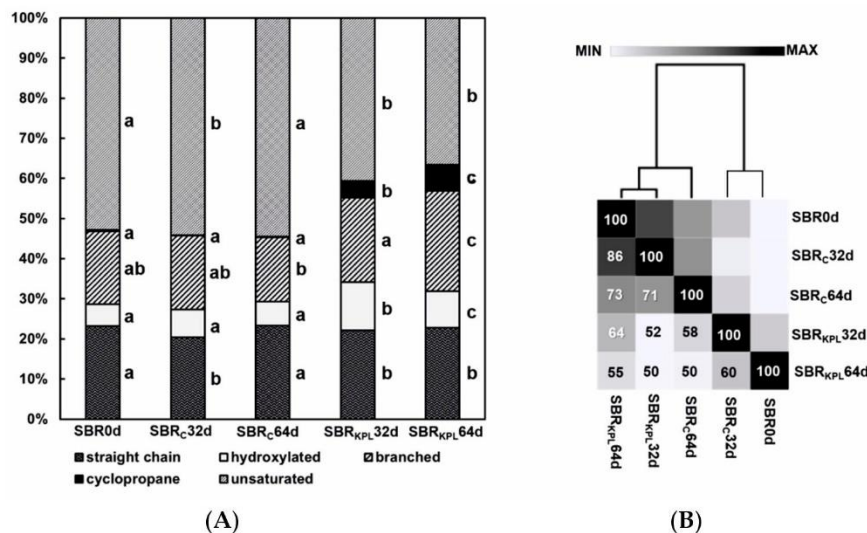


Figure 7. The percentages of distinct fatty acids isolated from the AS at the beginning (0d) and after 32 and 64 days of wastewater treatment in the SBR_C and SBR_{KPL} (A) and cluster display of the values of similarity coefficients (SIM) between the structure of microbial communities in the AS based on the FAME profile analysis (B).

3.5. Multifactorial Analysis of the Analyzed Parameters

In this study, wastewater quality was the factor that had an effect on the alterations in the AS. A cluster analysis of the studied biological units that was based on the operational parameters of wastewater treatment and AS quality, diversity, and functional capacity indices as well as significant fatty acids is presented in Figure 8A. This enabled two main separate clusters to be distinguished. One cluster included the N-USE index, selected fatty acids, pH, and the Gini coefficient, whereas the operational parameters of the wastewater treatment, diversity, and functional capacity indices, enzymatic activity, THB counts and the P-USE index were grouped in the second cluster. Moreover, this analysis separated the two clusters in terms of the SBRs treatment over time. In the first cluster, two subgroups were distinguished and grouped together. The first subgroup included the SBR_{0d} , whereas SBR_{C32d} and SBR_{C64d} belonged to the second subgroup. The second cluster included only the SBR_{KPL} . The values of the operational parameters of the wastewater treatment and the AS quality that were grouped in the first cluster were higher for the uncontaminated sludge compared to the polluted one. An opposite trend was observed in the case of the factors that were grouped in the second

cluster. A cluster analysis of the SBR_C and SBR_{KPL} based on the ability of the microbial communities to utilize the various carbon sources is presented in Figure 8B. It enabled three main separate clusters to be distinguished. The first cluster included Tween 80, α -D-lactose, α -ketobutyric acid, and D-mannitol, whereas the third cluster included PA, L-arginine, L-asparagine, phenylethylamine, β -methyl-D-glucoside, and N-acetyl-D-glucosamine. In turn, CA, P, and the other available compounds belonged to the second largest cluster. A cluster analysis of the studied AS in terms of their treatment over time also distinguished two separate clusters with two subgroups in the first one. The first subgroup included SBR_{0d} , SBR_{C64d} , and SBR_{KPL64d} , whereas SBR_{C32d} and SBR_{KPL32d} belonged to the second subgroup. Moreover, the second cluster included the AS cotreated with the 5.5% KPL. It was revealed that most of the substrates that belonged to the second subgroup were not utilized by the AS exposed to the leachate.

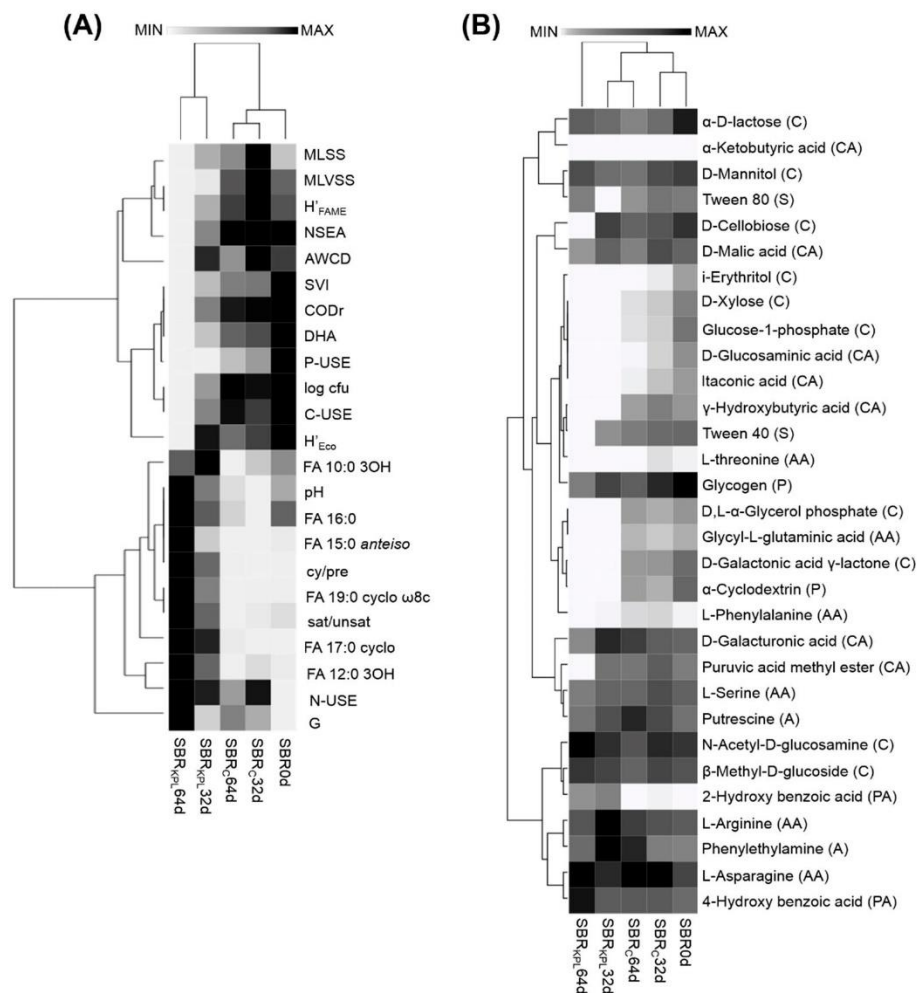


Figure 8. Heat map and cluster analysis based on significant Spearman's rank correlation coefficients calculated for the operational parameters of the SBR, microbial activity, structural diversity, and functional capacity indices, significant fatty acids, and FAMES biomarkers (A) and Biolog® EcoPlate™ carbon sources utilization patterns (B) at the beginning (0d) and after 32 and 64 days of wastewater treatment in the SBR_C and SBR_{KPL} . All data values were normalized and presented as a color scale ranging from white (MIN, 0) to black (MAX, 1).

3.6. Microscopic Analysis of the AS

After 64 days of the experiment the microscopic observations of the uncontaminated and contaminated AS were performed. They revealed that flocs in the polluted AS were smaller with a much looser structure and a less regular shape (Figure 9A,B) compared to the flocs in the unpolluted AS (Figure 9I,J). Simultaneously, the abundance of filamentous bacteria that were attached to the sludge flocs in the SBR_{KPL} was higher and the amount of extracellular polymeric substances was lower compared to their content in the SBR_C. A bright-field microscopic observation of the AS confirmed the lower diversity of protozoan in the SBR_{KPL} (Figure 9K–P) than in the SBR_C, which were represented by ciliates (Figure 9K–M), suctorians (Figure 9O,P), and filamentous bacteria (Figure 9I,J,M). Additionally, numerous empty Arcella shells occurred in this bioreactor (Figure 9N). In SBR_C, mainly rotifers (Figure 9E), ciliates (Figure 9G,H), live Arcella cells (Figure 9F), and Zoogaea fingered in the gelatinous matrix (Figure 9C,D) were present.

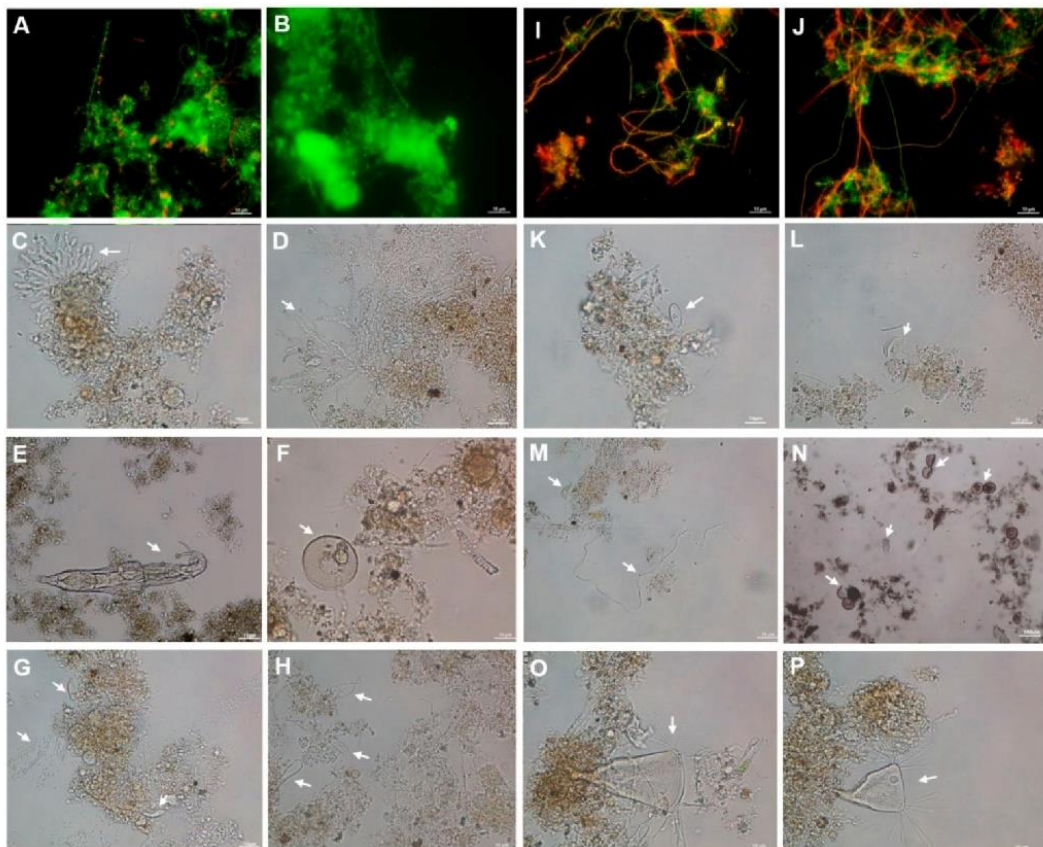


Figure 9. Structure of the AS flocs from the SBR_C (A,B) and SBR_{KPL} (H,I) after 64 days of wastewater treatment. The occurrences of selected microorganisms are marked with white arrows that indicated Zoogaea fingered in gelatinous matrix (C,D), rotifers (E), Arcella (F), free bacteria (G), ciliate, and filamentous bacteria (G,H) in the SBR_C, as well as ciliate (K,L,M), filamentous bacteria (M), empty Arcella shells (N), Vorticella (N), and suctorians (O,P) in the SBR_{KPL}.

4. Discussion

AS technology is considered to be the most efficient and economical approach for achieving the desired quality of wastewater mixed with landfill leachate [16]. Although the cotreatment of the landfill leachate in the WWTP may be appropriate under some circumstances [53], the inherent

variability in the leachate composition necessitates a conservative strategy due to the increasingly stringent water quality emission limits that have been placed on the biological treatment units by the Urban Wastewater Directive (91/271/EEC; EEC, 1991) and the Water Framework Directive (2000/60/EC; EU, 2000). Despite the abundance of studies that have been performed on the cotreatment of the landfill leachate in sewage plants, knowledge about the long-term effect of its occurrence in the effluent on activated sludge ecosystem remains limited.

Among many parameters that enable the alternations in the leachate quality to be evaluated, the pH value is considered to be an indicator of its aggressiveness. The alkaline KPL used in this study can be classified according to El-Fadel et al. [54] as an old and stabilized leachate. It was also characterized by a moderately high strength of recalcitrant phenolic compounds, which had a concentration that surpassed the allowable limits [29] by more than three orders of magnitude. Moreover, the low BOD_{st} level of the KPL compared with its COD value confirmed a large amount of non-biodegradable organic matter. In addition, the LPI value of the KPL was more than 5-fold higher than the standard LPI value for the treated leachate disposal limit for inland surface water (7.378), which revealed its high pollution potential [55]. It was reported that a high concentration of $N-NH_4^+$ in the leachate can disrupt its biological treatment due to the toxicity of this compound [56,57]. Although the concentration of ammonium in the tested KPL was almost 40-fold higher than the limits [29], its content was near the lower limit reported for an old leachate (360 to 2150 mg/L) [54]. The performed analysis of specific microbial groups indicated that the investigated landfill leachate may be a sanitary and epidemiological hazard. The abundance of total coliforms as well as fecal indicator bacteria in the KPL could have been the result of the significant content of phosphates, which augmented their survival in the leachate [58]. Coliform bacteria have recently been recognized as one of the most problematic pollutants in an old leachate [59].

The AS process is often indicated as being a good solution for leachate treatment [53]. However, the information about the leachate toxicity towards the sludge microbial communities is very scarce. It is known that individual xenobiotics are toxic to microorganisms to a different extent [60]. However, the leachate toxicity is a result of the synergistic or antagonistic effects of various contaminants [61]. Therefore, the volumetric ratios of the leachate that is added to domestic wastewater usually do not exceed 10% [2,61,62]. This study showed that the KPL had an extremely detrimental effect on the AS microorganisms, even in the presence of 6.69%. The long-term presence of the KPL in the effluent significantly disrupted the biological treatment of the wastewater in the SBR by affecting its operational parameters. It was found that the poor quality of the leachate resulted in a gradual decrease in CODr in the SBR_{KPL} from 95% to 69% and 41% during the cotreatment with 3.5% and 5.5% of the leachate, respectively. A similar phenomenon has been observed in the decrease in CODr from 90% to 70% and 51% in a bench scale reactor cotreated with 2% and 5% of the landfill leachate, respectively [4].

The appropriate pH is a crucial factor for the stable operation of a sewage plant because it affects the strength and surface charge of the AS flocs [63]. Extreme pH conditions can lead to an inhibition of the growth of the AS microorganisms [64]. In addition, the removal of xenobiotics, such as phenol and its derivatives, from the wastewater by the AS may also decrease with an increase in the effluent pH [65,66]. It can be concluded that a gradual increase in the pH value of more than 9.0 in the SBR_{KPL} negatively affected the microbial biodegradation of the contaminants in the sewage. Two-fold and 3-fold decreases in the ability of AS to settle were observed with an increase in pH from 7.6 to 8.1 and 9.3 in the SBR_{KPL32d} and SBR_{KPL64d} , respectively. Similarly, Ghanizadeh and Sarrafpour [67] found that an increase in pH from 5.7 to 9.0 resulted in a significant decrease in the SVI from 96 to 44 mL/g. A considerable drop in the SVI from 90 and 80 mL/g to 30 and 20 mL/g was also observed with an increase in the concentration of leachate from a municipal solid waste dumpsite in wastewater from 2.5 to 15% and 40% in India and Poland, respectively [16,68]. An SVI below 70 mL/g may result in the turbid effluent associated with the dispersed growth of microorganisms and the formation of small pin flocs [69].

The next critical factor for ensuring the biological wastewater treatment process and thus the correct operational behavior in the sewage plants is AS concentration. In this study, the MVLSS in the SBR_{KPL} 64d constituted 63% of the MLSS concentration and was below the appropriate level for pollutant removal in the SBR system [70]. It can be concluded that the compounds present in the KPL may not be used for the maintenance and growth of the AS microorganisms. Moreover, their occurrence in the SBR may inhibit or slow down the utilization of the readily biodegradable components present in the sewage [71]. In this study, the inhibition of the utilization of 10 and 12 substrates in an EcoPlateTM was observed for SBR_{KPL} after cotreatment with 3.5% and 5.5% KPL compared to SBR_{CTL}, respectively. The microorganisms in the SBR_{CTL} were able to use the ingested biodegradable matter in the wastewater to synthesize the new biomass, which resulted in an increase of the MVLSS and MLSS. The increase of suspended matter in the SBR_C may be attributed to the increase in the amounts of the extracellular polymeric substances as a result of the presence of *Zooglea* sp. in the wastewater. A decrease in the microbial biomass in the SBR_{KPL} directly affected the structure and quality of the AS flocs, which was manifested in a change in the size and shape of the aggregates, which became smaller, looser and more irregular than those in the SBR_C. Similarly, Pieczykolan et al. [16] observed a gradual increase in the size of the small flocs when the concentration of the leachate exceeded 15%. The cotreatment with KPL also resulted in a decrease in the abundance of protozoan in the AS. The decrease in the number of Arcella, which was the most common genera in the AS, as well as the appearance of individuals from the Vorticella genus and a significant number of filamentous bacteria in the SBR_{KPL} may be connected with the presence of leachate in the wastewater and may be correlated with a decrease in the effectiveness of the cotreatment. In the research by Czapluk et al. [72], more diverse protozoan and metazoan communities were observed in the WWTP in which domestic effluent predominated, while ciliates and metazoans did not occur or were found at very low densities in the AS that had primarily received industrial wastewater.

Because of their quick reaction to the changes in the ambient environment, the AS microorganisms are considered to be a sensitive bioindicator of the response of biological wastewater treatment units to various stress factors and perturbations [73]. The results presented in this study indicate that the addition of the KPL into the wastewater significantly reduced the enzymatic activity of the dehydrogenases and esterases in the AS, which could not recover after long-term exposure to the leachate. Previous literature indicated that the activity of esterases and dehydrogenases may decrease in the AS in the presence of the more complex contaminants occurred in the leachate [74–76]. Although the activity of the AS microorganisms is extremely important for appropriate functioning of this ecosystem, this parameter is hardly ever considered during the evaluation of the effect of a leachate on the WWTP functionality. The impact of different concentrations of the leachate from the WENT landfill (China) on dehydrogenase activity in an AS reactor was only described by Li and Zhao [56], who observed a decrease in the respiratory activity by 12, 16, 17, 32, and 47% in the presence of 1, 2, 4, 9, and 20% of the leachate, respectively.

The high metabolic capacity of the AS microbial communities is considered to be a pivotal factor for efficient wastewater treatment in the biological units [77]. The microorganisms in the SBR_{KPL} were less metabolically active than the bacteria in the SBR_C. Although the leachate affected the microbial growth in the AS, thus contributing to an extension of the duration of the adaptation phase, the t_{50} did not change significantly. It can be assumed that the presence of the KPL in the wastewater had a toxic effect on the core populations in the AS. It was also shown that the low AS metabolic activity after contamination was correlated with a lack of the ability of its microbial communities to utilize specific compounds, in particular, the phosphorus sources. The changes in the CLPP patterns for the SBR_{KPL} may suggest that the occurrence of the leachate in the wastewater led to the metabolic specialization of the AS microorganisms. The functional diversity of the AS microorganisms exposed to a landfill leachate is poorly documented in the literature. The research by Röling et al. [78] indicated that the microbial communities in an aquifer contaminated with the leachate from Banisveld landfill (Boxtel, The Netherlands) favored the aromatic substrates among the other carbon sources in an EcoPlateTM.

Moreover, Taş et al. [79] showed a significant increase in the abundance of the genes that belong to the carbohydrate and xenobiotic metabolism categories in groundwater polluted with the same leachate. Similarly, in this study the microorganisms from the SBR_{KPL} increased their metabolism in relation to the carbohydrates and phenolic compounds. The significant decrease in the microbial metabolic activity and the increase in the inequality of the bacterial abundance that was observed in the SBR_{KPL} strongly correlated with a decrease in the functional capacity. This may indicate a loss of the functionally significant microorganisms such as phosphate-solubilizing bacteria in the AS during the leachate cotreatment. By contrast, the microbial populations in the SBR_{KPL} metabolized the compounds containing nitrogen more intensively than the microorganisms in the SBR_C. It may be suggested that the loss of phosphorus utilization as well as the increase in nitrogen metabolism in the SBR_{KPL} may be related to the predominance of bacterial species originated from the leachate.

In this work, very interesting results regarding the alterations in the structural diversity of microorganisms in the AS were obtained. Over the course of the experiment the contribution of the microorganisms can be ordered as follows; BG- > F > BG+ > Pr > Ac and BG- > BG+ > F > Ac > Pr in the SBR_C and SBR_{KPL}, respectively. The prevalence of BG- over the other microbial groups was observed in both of the tested bioreactors. Due to their highly impermeable outer membrane, BG- have generally been recognized as being more tolerant than BG+ to the various hydrocarbons commonly found in landfill leachate [80,81]. Nonetheless, a gradual decrease in the content of the BG- biomarkers accompanied by a significant increase in the percentages of the FAME markers for BG+ was observed during the cotreatment with the KPL. Similar observations were made by Leal et al. [81], who found that the introduction of petrol into compost resulted in a significant decrease in the content of the FAME markers for BG- along with a simultaneous increase in the content of the biomarkers for BG+. It was reported that BG+ can exhibit a high metabolic capability towards various contaminants, which may result in their predominance in a contaminated environment [82]. Here, the decrease in the abundance of the BG- biomarkers in the SBR_{KPL} was followed by a decrease in the distribution of the fungal and protozoan FAME markers. Although the abundance of fungi in the AS is rather low, they are involved in many important processes during wastewater treatment due to a versatile pollutant-degrading capacity [83]. Since the changes in the occurrence of fungi in the AS are mainly associated with pH fluctuations, it may be suggested that the gradual increase in wastewater pH during the KPL cotreatment may negatively have affected the fungal population in the SBR_{KPL}, which contributed to the loss of important catabolic activity in this environment. Furthermore, the multiplication of the Actinomycetes in the SBR_{KPL} may adversely affect the wastewater treatment process and the sludge quality [84].

The identified changes in the FAME profiles of the AS indicated that the microorganisms were very sensitive to the contamination and exhibited adaptive mechanisms to the presence of the KPL in the wastewater. The essential changes in the bacteria FAME patterns were related to an increase in the content of the 16:0, 3-hydroxy, and 15:0 *anteiso*-branched fatty acids, which were responsible for rigidification of the cytoplasmic membrane. Furthermore, a gradual increase in the saturation of fatty acids in bacterial membrane along with an increase of pollutant concentration could be associated with the stimulation of cyclopropane fatty acid formation by some bacterial strains [85]. Interestingly, there was also a significant increase in the percentages of the *anteiso*-branched fatty acids in the FAME profiles under the KPL contamination. The branched fatty acids play an important role in the microbial tolerance to pH stress [86]. Therefore, it can be suggested that an increase in the yield of the *anteiso/iso*-branched fatty acids in the FAME patterns, which was observed in this study, may be a result of the microbial response to the pH stress resulted from the presence of the KPL in the wastewater.

Multivariate analysis in this work allowed establishing of important relationships between operational parameters of wastewater treatment process and factors affecting activated sludge quality. It was found that the presence of the KPL in the wastewater was the main factor responsible for variations in the activated sludge. There was a close relationship between the microbial activity of the sludge, ability of the AS microorganisms to utilize carbon sources and important operational

parameters of wastewater treatment process. The operation parameters of the reactor were positively correlated with enzymatic activity, metabolic capacity and structural diversity of microorganisms in the AS and negatively correlated with content of selected fatty acids. A significant decrease in the ability of microorganisms to utilize carbon, phosphorus and nitrogen sources may be a good indicator of weakening their metabolic functions. Interestingly, a multivariate analysis showed that the selected fatty acids can be used as indicators of structural diversity of microbial communities and xenobiotic degradation. A significant increase in the content of 3-hydroxy fatty acids and cyclopropane fatty acids in the presence of the KPL can be considered as useful biomarkers of stress condition [87]. Combining physicochemical and biological analyzes seems necessary to accurately identify the major factors affecting activated sludge operation and quality, especially when they achieve critical levels.

5. Conclusions

This work underscores the importance of effluent quality assessment in parallel with the analysis of the microbial enzymatic activity, functional capacity and structural diversity of activated sludge microorganisms to get knowledge and improve the operational conditions in sewage treatment systems. Among traditional methods for effluent analysis, the use of the Biolog EcoPlate technique as well as the FAME analysis proved to be very useful in getting a comprehensive insight into the microbiological process of wastewater treatment. Predicting the response of microorganisms to any disturbances caused by the leachate can be a promising tool in alleviating or even preventing the operational problems in large-scale WWTPs. The application of a multifactorial analysis of the parameters relevant to the wastewater treatment process in this study demonstrated that the presence of the leachate changed the conditions in the WWTP and led to disturbances associated with the structure and settling ability of the activated sludge. Additionally, the KPL significantly affected the enzymatic activity of this ecosystem. The obtained results clearly indicate that the microbial communities in the KPL were able to thrive in the presence of the various contaminants occurred in the leachate; however, they exhibited a low functional capacity. For this reason, they probably will not be capable of executing biological functions beginning with healthy agriculture and ending with ecosystem bioremediation. In conclusion, future studies will be focused on increasing the efficiency of the COD removal of the KPL contaminants in wastewater as well as on the implementation of new strategies that are designed to protect the structure and function of the activated sludge microbial communities against various xenobiotics.

Author Contributions: Conceptualization, J.M., A.M., and I.G.; formal analysis, J.M. and J.Ż.; data curation, J.M. and D.W.; writing—original draft preparation, J.M. and A.M.; writing—review and editing, A.M.; visualization, J.M.; supervision, A.M.; project administration, J.M. and A.M.; funding acquisition, J.M. and A.M.

Funding: The paper was prepared in connection with the work done under the project granted on the basis of decision DEC-2016/23/N/NZ9/00158 and financed by the National Science Centre (Poland).

Acknowledgments: The research was performed by the courtesy of the Chorzowski-Świętochłowickie Municipal Water and Sewage Company LLC and the Head of Wastewater Treatment Plant MSc Piotr Banaszek. The authors are also very grateful to Paweł Franczak for advice on mathematical modeling of CLPP kinetic parameters.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. EEA. *Dangerous Substances in Waste. Technical Report No 38*; European Environmental Agency: Copenhagen, Denmark, 2000.
2. Yu, J.; Zhou, S.; Wang, W. Combined treatment of domestic wastewater with landfill leachate by using A2/O process. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *178*, 81–88. [[CrossRef](#)]
3. Brennan, R.B.; Healy, M.G.; Morrison, L.; Hynes, S.; Norton, D.; Clifford, E. *Suitability of Municipal Wastewater Treatment Plants for the Treatment of Landfill Leachate. EPA Research Report (2013-W-FS-13)*; Environmental Protection Agency: Wexford, Ireland, 2017.
4. De Albuquerque, E.M.; Pozzi, E.; Sakamoto, I.K.; Jurandy, P. Treatability of landfill leachate combined with sanitary sewage in an activated sludge system. *J. Water Process Eng.* **2018**, *23*, 119–128. [[CrossRef](#)]

5. Grosser, A.; Neczaj, E.; Madela, M.; Celary, P. Treatment of landfill leachate using ultrasound assisted SBR reactor. *Proceedings* **2018**, *2*, 648. [[CrossRef](#)]
6. Pitchel, J. *Waste Management Practices: Municipal, Hazardous, and Industrial*, 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2015.
7. Masoner, J.R.; Kolpin, D.W.; Furlong, E.T.; Cozzarelli, I.M.; Gray, J.L. Landfill leachate as a mirror of today's disposable society: Pharmaceuticals and other contaminants of emerging concern in final leachate from landfills in the conterminous United States. *Environ. Toxicol. Chem.* **2016**, *34*, 906–918. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Slack, R.J.; Gronow, J.R.; Voulvoulis, N. Household hazardous waste in municipal landfills: Contaminants in leachate. *Sci. Total Environ.* **2004**, *337*, 119–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Toretta, V.; Katsoyiannis, I.A.; Tolkou, A.K.; Airoidi, M.; Ferronato, N. Novel and conventional technologies for landfill leachates treatment: A review. *Sustainability* **2016**, *9*, 9. [[CrossRef](#)]
10. Willén, B.M.; Jin, B.; Lant, P. The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties. *Water Res.* **2003**, *38*, 3909–3919. [[CrossRef](#)]
11. El Fantroussi, S.; Agathos, S.N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr. Opin. Microbiol.* **2005**, *8*, 268–275. [[CrossRef](#)]
12. Sipma, J.; Osuna, M.B.; Emanuelsson, M.A.E.; Castro, P.M.L. Biotreatment of industrial wastewaters under transient-state conditions: Process stability with fluctuations of organic load, substrates, toxicants, and environmental parameters. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* **2010**, *40*, 147–197. [[CrossRef](#)]
13. Jiang, H.L.; Tay, J.H.; Tay, S.T.L. Changes in structure, activity and metabolism of aerobic granules as a microbial response to high phenol loading. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *63*, 602–608. [[CrossRef](#)]
14. Marrot, B.; Barrios-Martinez, A.; Moulin, P.; Roche, N. Biodegradation of high phenol concentration by activated sludge in an immersed membrane bioreactor. *Biochem. Eng. J.* **2006**, *30*, 174–183. [[CrossRef](#)]
15. Siripattanakul-Ratpukdi, S. Phenolic based pharmaceutical contaminated wastewater treatment kinetics by activated sludge process. *J. Clean Energ. Technol.* **2014**, *2*, 150–153. [[CrossRef](#)]
16. Pieczykolan, B.; Płonka, I.; Kosel, M. Changes of the quality of activated sludge during the biological treatment of landfill leachate. *Environ. Prot. Eng.* **2016**, *42*, 33–42. [[CrossRef](#)]
17. Tkaczyk, A.M.; Pietrzak, M.; Kołak, G. Case of the environment reclamation in the region of Kalina Pond in Świętochłowice. *Pol. Geol. Inst. Spec. Pap.* **2005**, *17*, 77–83.
18. EN ISO 5667-13:2011. *Water Quality—Sampling—Guidance on Sampling of Sludges*; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2011.
19. EN ISO 19458:2007P. *Water Quality—Sampling for Microbiological Analysis*; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2007.
20. Michalska, J.; Wojcieszewska, D.; Greń, I. Investigation of functional diversity and activated sludge condition using Biolog[®] system. *ACEE J.* **2016**, *1*, 119–126. [[CrossRef](#)]
21. PN-ISO 10390:1997. *Soil Quality—pH Determining*; Polish Committee for Standardization: Warsaw, Poland, 1997. (In Polish)
22. PN-ISO 7150-1:2002. *Water Quality—Determination of Ammonium Nitrogen—Part 1: Manual Spectrometric Method*; Polish Committee for Standardization: Warsaw, Poland, 2002. (In Polish)
23. PN-ISO 6439:1994. *Water Quality—Determination of Phenol Index—4-Aminoantipyrine Spectrometric Methods after Distillation*; Polish Committee for Standardization: Warsaw, Poland, 1994. (In Polish)
24. PN-C-04576-4:1994. *Water and Sewage—Studies on the Content of Nitrogen Compounds—Determination of Ammonium Nitrogen by Direct Nesslerization*; Polish Committee for Standardization: Warsaw, Poland, 1994. (In Polish)
25. PN-82/C-04576/08:1982. *Water and Sewage—Studies on the Content of Nitrogen Compounds—Determination of Nitrate Nitrogen by the Colorimetric Method Using Sodium Salicylate*; Polish Committee for Standardization: Warsaw, Poland, 1982. (In Polish)
26. PN-73/C-04576/06:1973 *Water and Sewage—Studies on the Content of Nitrogen Compounds—Determination of Nitrite Nitrogen by the Colorimetric Method Using Sulfanilic Acid and α -Naphthylamine*; Polish Committee for Standardization: Warsaw, Poland, 1973. (In Polish)
27. Hagman, M.; Jansen, J.L.C. Oxygen uptake rate measurements for application at wastewater treatment plants. *Vatten* **2007**, *63*, 131–138.
28. APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*; American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation: Washington, DC, USA, 1999.

29. ECOLEX. Order of the Minister of Environment Laying Down Conditions for the Introduction of Sewage Into Water Bodies or Soil and Laying Down the List of Substances Particularly Harmful to Water Environments. Poland, 2014. Available online: <https://www.ecolex.org/details/legislation/regulation-laying-down-conditions-for-the-introduction-of-sewage-into-water-bodies-or-soil-and-laying-down-the-list-of-substances-particularly-harmful-to-water-environments-lex-faoc073889/> (accessed on 27 May 2019).
30. EN ISO 8199:2010. *Water Quality—General Requirements and Guidance for Microbiological Examinations by Culture*; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2010.
31. EN ISO 9308-1:2014-12/A1:2017-04. *Water Quality—Enumeration of Escherichia Coli and Coliform Bacteria—Membrane Filtration Method for Waters with Low Bacterial Background Flora*; Polish Committee for Standardization: Warsaw, Poland, 2017.
32. Molina-Muñoz, M.; Poyatos, J.M.; Rodelas, B.; Pozo, C.; Manzanera, M.; Hontoria, E.; González-López, J. Microbial enzymatic activities in a pilot scale MBR experimental plant under different working conditions. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 696–704. [[CrossRef](#)]
33. Miksch, K. Application of dehydrogenase activity determinations in biodegradation of refinery sewage. *Gas Water Civ. Technol.* **1977**, *51*, 234–235.
34. Schumacher, T.E.; Eynard, A.; Chintala, R. Rapid cost-effective analysis of microbial activity in soils using modified fluorescein diacetate method. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 4759–4762. [[CrossRef](#)]
35. Caglar, M.U.; Teufel, A.I.; Wilke, C.O. Sicegar: R package for sigmoidal and double-sigmoidal curve fitting. *PeerJ.* **2008**, *6*, 1–16. [[CrossRef](#)]
36. Peleg, M.; Corradini, M.G.; Normand, M.D. The Logistic (Verhulst) model for sigmoid microbial growth curves revisited. *Food Res. Int.* **2007**, *40*, 808–818. [[CrossRef](#)]
37. Olyphant, T.E. Python for scientific computing. *Comput. Sci. Eng.* **2007**, *9*, 10–20. [[CrossRef](#)]
38. Woźnica, A.; Nowak, A.; Beimfohr, C.; Karczewski, J.; Bernas, T. Monitoring structure and activity of nitrifying bacterial biofilm in an automatic biodetector of water toxicity. *Chemosphere* **2010**, *78*, 1121–1128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Muñoz, S.; Lacarta, J.; Pata, M.P.; Jiménez, J.J.; Navarro, E. Analysis of the diversity of substrate utilization of soil bacteria exposed to Cd and earthworm activity using generalized additive models. *PLoS ONE* **2014**, *9*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Yu, Z.; Hu, Y.; Dzakpasu, M.; Wang, C.X.; Ngo, H.H. Dynamic membrane bioreactor performance enhancement by powdered activated carbon addition: Evaluation of sludge morphological, aggregative and microbial properties. *J. Environ. Sci.* **2018**, *75*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Al-Mutairi, N.Z. Variable distributional characteristics of substrate utilization patterns in activated sludge plants in Kuwait. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 1524–1532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Nowak, A.; Mroziak, A. Degradation of 4-chlorophenol and microbial diversity in soil inoculated with single *Pseudomonas* sp. CF600 and *Stenotrophomonas maltophilia* KB2. *J. Environ. Manage.* **2018**, *215*, 216–229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Kozdrój, J. Microflora of technogenic wastes characterized by fatty acid profiling. *Microb. Res.* **2000**, *155*, 149–156. [[CrossRef](#)]
44. Son, K.S.; Hall, E.R. Use of a similarity index based on microbial fatty acid (MFA) analysis to monitor biological wastewater treatment systems. *Environ. Technol.* **2003**, *24*, 1147–1155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Moore-Kucera, J.; Dick, R.P. PLFA profiling of microbial community structure and seasonal shifts in soils of a Douglas-fir chronosequence. *Microbiol. Ecol.* **2008**, *55*, 500–511. [[CrossRef](#)]
46. He, Y.; Ding, N.; Shi, J.; Wu, M.; Liao, H.; Xu, J. Profiling of microbial PLFAs: Implications for interspecific interactions due to intercropping which increase phosphorus uptake in phosphorus limited acidic soils. *Soil Biol. Biochem.* **2013**, *57*, 625–634. [[CrossRef](#)]
47. Frostegård, Å.; Tunlid, A.; Bååth, E. Use and misuse of PLFA measurements in soils. *Soil Biol. Biochem.* **2011**, *43*, 1621–1625. [[CrossRef](#)]
48. Zelles, L. Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities. *Chemosphere* **1997**, *35*, 275–294. [[CrossRef](#)]
49. Madan, R.; Pankhurst, C.; Hawke, B.; Smith, S. Use of fatty acids for identification of AM fungi and estimation of the biomass of am spores in soil. *Soil Biol. Biochem.* **2002**, *34*, 125–128. [[CrossRef](#)]
50. Marczenko, Z. *Spectrophotometric Determination of Elements*; Scientific Publisher NPS: Warsaw, Poland, 1997.

51. Kumar, D.; Alappat, B.J. Evaluating leachate contamination potential of landfill sites using leachate pollution index. *Clean Techn. Environ.* **2005**, *7*, 190–197. [[CrossRef](#)]
52. Werker, A.G.; Becker, J.; Huitema, C. Assessment of activated sludge microbial community analysis in full-scale biological wastewater treatment plants using patterns of fatty acid isopropyl esters (FAPes). *Water Res.* **2003**, *37*, 2162–2172. [[CrossRef](#)]
53. Wang, K.; Lusheng, L.; Tan, F.; Wu, D. Treatment of landfill leachate using activated sludge technology: A review. *Archaea* **2018**, 1–10. [[CrossRef](#)]
54. El-Fadel, M.; Sleem, E.F.; Hashisho, J.; Saikaly, P.E.; Alameddine, I.; Ghanimeh, S. Impact of SRT on the performance of MBRs for the treatment of high strength landfill leachate. *Waste Manag.* **2017**, *73*, 166–180. [[CrossRef](#)]
55. Kumar, D.; Alappat, B.J. Analysis of the leachate contamination potential of municipal landfill using leachate pollution index. *Waste Manag. Res.* **2003**, *23*, 230–239. [[CrossRef](#)]
56. Li, X.Z.; Zhao, Q.L. Inhibition of microbial activity of activated sludge by ammonia in leachate. *Environ. Int.* **1999**, *25*, 961–968. [[CrossRef](#)]
57. Deng, Y.; Englehardt, J.D. Electrochemical oxidation for landfill leachate treatment. *Waste Manag.* **2007**, *27*, 380–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Chudoba, E.A.; Mallin, M.A.; Cahoon, L.B.; Skrabal, S.A. Stimulation of fecal bacteria in ambient waters by experimental inputs of organic and inorganic phosphorus. *Water Res.* **2013**, *47*, 3455–3466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Aziz, S.Q.; Aziz, H.A.; Yusoff, M.S.; Mohaheri, S. Removal of phenol and other pollutants from different landfill leachates using powdered activated carbon SBR supplemented technology. *Environ. Monit. Assess.* **2012**, *184*, 6147–6158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Tobajas, M.; Verdugo, V.; Polo, A.M.; Rodriguez, J.J.; Mohedano, A.F. Assessment of toxicity and biodegradability on activated sludge of priority and emerging pollutants. *Environ. Technol.* **2016**, *37*, 713–721. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Kalka, J. Landfill leachate toxicity removal in combined treatment with municipal wastewater. *Sci. World J.* **2012**, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Campos, R.; Ferraz, F.M.; Viera, E.M.; Povinelli, J. Aerobic co-treatment of landfill leachate and domestic wastewater—Are slowly biodegradable organics removed or simply diluted. *Water Sci. Technol.* **2014**, *70*, 1941–1947. [[CrossRef](#)]
63. Hong, E.; Yeneh, A.M.; Kayaalp, A.; Sen, T.K.; Ang, H.M.; Kayaalp, M. Rheological characteristic of municipal thickened excess activated sludge (TEAS): Impacts of pH, temperature, solid concentration and polymer dose. *Res. Chem. Intermediat.* **2016**, *42*, 6567–6585. [[CrossRef](#)]
64. Bitton, G. *Wastewater Microbiology*, 3rd ed.; John Wiley and Sons: New York, NY, USA, 2005.
65. Duan, Z. Microbial degradation of phenol by activated sludge in a batch reactor. *Environ. Prot. Eng.* **2011**, *37*, 53–63.
66. Cozma, P.; Hilhor, R.M.; Apostol, L.C.; Diaconu, M.; Pogăcean, M.O.; Gavrilăscu, M. Aerobic biodegradation of phenol by activated sludge in a batch reactor. *Environ. Eng. Manag. J.* **2012**, *11*, 2053–2058. [[CrossRef](#)]
67. Ghanizadeh, G.; Sarrafpour, R. The effects of temperature and pH on the settleability of activated sludge flocs. *Iran. J. Publ. Health* **2001**, *30*, 139–142.
68. Ranjan, K.; Chakraborty, S.; Verma, M.; Iqbal, J.; Kumar, R.N. Co-treatment of old landfill leachate and municipal wastewater in sequencing batch reactor (SBR): Effect of landfill leachate concentration. *Water Qual. Res. J. Can.* **2016**, *51*, 377–387. [[CrossRef](#)]
69. Palm, J.; Jenkins, D. Relationship between loading, dissolved oxygen concentration and sludge settleability in the completely mixed activated sludge process. *J. Water Pollut. Control Fed.* **1980**, *52*, 2484–2506.
70. Wang, L.K.; Shammass, N.K.; Hung, J. *Advanced Biological Treatment Processes*; Humana Press: New York, NY, USA, 2010.
71. Çeçen, F.; Tezel, U. *Hazardous Pollutants in Biological Treatment Systems: Fundamentals and a Guide to Experimental Research*; IWA Publishing: London, UK, 2018.
72. Czapluk, B.; Rutkowski, R.; Rybak, J. Microfauna composition of activated sludge in domestic and industrial sewage activated sludge systems. *Environ. Prot. Eng.* **2018**, *44*, 153–166. [[CrossRef](#)]
73. Griebe, T.; Schaule, G.; Wuertz, S. Determination of microbial respiratory and redox activity in activated sludge. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, *19*, 118–122. [[CrossRef](#)]

74. Boczar, B.A.; Forney, L.J.; Begley, W.M.; Larson, R.J.; Fedler, T.W. Characterization and distribution of esterase activity in activated sludge. *Water Res.* **2001**, *35*, 4208–4216. [[CrossRef](#)]
75. Yao, Y.; Lu, Z.; Min, H.; Gao, H.; Zhu, F. The effect of tetrahydrofuran on the enzymatic activity and microbial community in activated sludge from a sequencing batch reactor. *Ecotoxicology* **2012**, *21*, 56–65. [[CrossRef](#)]
76. Feng, Q.; Xiao, Y.; Li, X.; Xue, Z.; Fang, F.; Cao, J. Using the dehydrogenase activity for alert of activated sludge system under different copper concentrations. *Desalin. Water Treat.* **2014**, *57*, 17836–17843. [[CrossRef](#)]
77. Xia, Y.; Wen, X.; Zhang, B.; Yang, Y. Diversity and assembly patterns of activated sludge microbial communities: A review. *Biotechnol. Adv.* **2018**, *36*, 1038–1047. [[CrossRef](#)]
78. Rölíng, W.F.; van Breukelen, B.M.; Braster, M.; van Verseveld, H.W. Linking microbial community structure to the pollution: Biolog-substrate utilization in and near a landfill leachate plume. *Water Sci. Technol.* **2000**, *41*, 47–53. [[CrossRef](#)]
79. Taş, N.; Brandt, B.W.; Braster, M.; Van Breukelen, B.M.; Rölíng, W.F.M. Surface landfill leachate contamination affects metabolic potential and gene expression in the Banisveld aquifer. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2018**, *94*, 1–12. [[CrossRef](#)]
80. Lázároaie, M.M. Multiple response of gram-positive and gram-negative bacteria to mixture of hydrocarbons. *Braz. J. Microbiol.* **2010**, *41*, 649–667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Leal, A.J.; Rodrigues, D.M.; de Cássia Rocha, R.; Fernandes, R.; Borges, A.C.; Lopes Júlio, A.D.; de Souza Freitas, F.; Tótola, M.R. Microbial inoculants development for bioremediation of gasoline and diesel contaminated soil. *OALib. J.* **2018**, *5*, 1–17. [[CrossRef](#)]
82. Erdoğán, E.; Şahin, F.; Namlı, A. Phospholipid fatty acids analysis-fatty acid methyl ester (PLFA-FAME) changes during bioremediation of crude oil contamination soil. *Afr. J. Biotechnol.* **2013**, *12*, 6294–6301. [[CrossRef](#)]
83. Peng, R.H.; Xiong, A.S.; Xue, Y.; Fu, X.Y.; Gao, F.; Zhao, W.; Tian, Y.S.; Yao, Q.H. Microbial degradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 927–955. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Bezak-Mazur, E.; Stoińska, R.; Rajca, J.; Lutasiewicz, B. Effect of the presence of *Actinomycetes* in the activated sludge on the quality of the treated wastewater. *E3S Web Conf.* **2017**, *17*, 1–8. [[CrossRef](#)]
85. Murínová, S.; Dercová, K. Response mechanisms of bacterial degraders to environmental contaminants on the level of cell walls and cytoplasmic membrane. *Int. J. Microbiol.* **2014**, 1–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Giotis, E.S.; McDowell, D.A.; Blair, I.S.; Wilkinson, B.J. Role of branched-chain fatty acids in pH stress tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 997–1001. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Segura, A.; Bernal, P.; Pini, C.; Krell, T.; Daniels, C.; Ramos, J.L. Membrane composition and modifications in response to aromatic hydrocarbons in Gramnegative bacteria. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*; Timmis, K.N., McGenity, T.J., van der Meer, J.R., de Lorenzo, V., Eds.; Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg, Germany, 2010; pp. 1595–1603.



II.4

Michalska J., Piński A., Żur J., Mroziak A. 2020a. Selecting bacterial candidates for the bioaugmentation of activated sludge to improve the aerobic treatment of landfill leachate. *Water*, 12(1): 1-26

Article

Selecting Bacteria Candidates for the Bioaugmentation of Activated Sludge to Improve the Aerobic Treatment of Landfill Leachate

Justyna Michalska *, Artur Piński , Joanna Żur  and Agnieszka Mrozik

Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection, Faculty of Natural Sciences, University of Silesia, Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, Poland; apinski@us.edu.pl (A.P.); joanna.zur@us.edu.pl (J.Ż.); agnieszka.mrozik@us.edu.pl (A.M.)

* Correspondence: jmichalska@us.edu.pl

Received: 6 November 2019; Accepted: 27 December 2019; Published: 1 January 2020



Abstract: In this study, a multifaceted approach for selecting the suitable candidates for bioaugmentation of activated sludge (AS) that supports leachate treatment was used. To determine the exploitation of 10 bacterial strains isolated from the various matrices for inoculating the AS contaminated with the Kalina pond leachate (KPL), their degradative potential was analyzed along with their aptitude to synthesize compounds improving remediation of pollutants in wastewater and ability to incorporate into the AS flocs. Based on their capability to degrade aromatic compounds (primarily catechol, phenol, and cresols) at a concentration of 1 mg/mL and survive in 12.5% of the KPL, *Pseudomonas putida* OR45a and *P. putida* KB3 can be considered to be the best candidates for bioaugmentation of the AS among all of the bacteria tested. Genomic analyses of these two strains revealed the presence of the genes encoding enzymes related to the metabolism of aromatic compounds. Additionally, both microorganisms exhibited a high hydrophobic propensity (above 50%) and an ability to produce biosurfactants as well as high resistance to ammonium (above 600 µg/mL) and heavy metals (especially chromium). These properties enable the exploitation of both bacterial strains in the bioremediation of the AS contaminated with the KPL.

Keywords: activated sludge; bacteria for bioaugmentation; catabolic traits; genomic sequencing; landfill leachate; selected features of bacteria

1. Introduction

Landfilling is currently the most common and the cheapest way to eliminate household, commercial, and industrial solid waste worldwide. However, a major drawback of this practice is the generation of heavily polluted leachate, which can contaminate the soil, groundwater, and surface water in the immediate vicinity of the landfill with hazardous substances [1,2]. Owing to the frequent discharge of the landfill leachate to the wastewater treatment plants (WWTPs), a variety of dynamically developing biological technologies in the world, including modern biological membrane reactors and bioelectrochemical systems, are implemented [3–6]. However, in the vast majority of WWTPs in Poland the landfill leachate treatment is still performed with the application of conventional activated sludge (AS) technology. Biological methods are considered to be a beneficial alternative to the physicochemical methods, which are the most cost intensive and have the inherent drawbacks due to the formation of toxic secondary compounds [3,7]. Implementing them for treating landfill leachate is extremely challenging, especially in the case of mature or old leachate due to its complex composition, fluctuations of dissolved organic carbon, and potential toxicity [8–10].

Although the successful treatment of landfill leachate by both conventional and granular AS has been reported in the literature [11–13], the number of reports that stress the negative impact of this

effluent on the sludge performance is definitely higher [14–19]. Because the AS process often cannot achieve an effective reduction of the chemical oxygen demand (COD) and total nitrogen in effluents contaminated with landfill leachate, this technology should be further improved in order to cope with the complex mixture of compounds as well as the fluctuations in the environmental factors associated with this type of wastewater.

The introduction of new metabolic functions into the AS by adding supplementary microorganisms, known as bioaugmentation, constitutes a promising approach for degrading recalcitrant compounds and may enable the performance of the AS process to be improved [20–22]. However, the usefulness of the microorganisms selected as candidates for the bioaugmentation of the AS is frequently limited by their low survival rate under the conditions that prevail in this ecosystem. The successful colonization of a bioreactor by inoculated bacteria is challenging as they are likely to encounter the following obstacles within the biological unit, i.e., environmental pressure due to protozoan grazing and/or competition with indigenous microorganisms as well as fluctuations of the abiotic factors such as temperature, pH, salinity, the hydrodynamic conditions, organic loading rate, and the availability of nutrients and oxygen, which causes them to die or to wash out of the system along with the effluent [23–26]. A versatile degradation capacity towards a variety of compounds is often reported as being a pivotal competence of potential candidates for bioaugmentation [27,28]. However, adding bacteria with the desirable catabolic capabilities into the AS does not always guarantee an enhanced biodegradation of the compounds in wastewater [29,30]. For this reason, the relative spatial and temporal abundance of inoculants and their ability to tolerate the conditions that prevail in the target environment is crucial to their survival.

To date, the majority of studies have only utilized one strain to inoculate the AS treating a synthetic wastewater contaminated with a single pollutant [31–33]. It is also worth stressing that the strains selected to bioaugment the AS in laboratory conditions often lose their ability to degrade contaminants after being inoculated into a bioreactor in a field experiment [34]. Taking this into account, the candidate bacteria for bioaugmentation should be carefully evaluated with respect to at least three criteria in order to confirm their predisposition to thrive in the conditions for which they were selected and that are designed to achieve an efficient performance [35]. They should be catabolically able to degrade the individual chemical components in a mixture of contaminants even in the presence of potentially inhibitory pollutants, persist and compete after their inoculation into a biosystem, and be compatible with autochthonous communities [34].

Utilizing microorganisms that have a proven degradative potential and survivability in the AS is crucial for successful bioaugmentation. In view of this, the aim of the present paper is to evaluate the selected bacterial strains in terms of their potential utilization in bioaugmentation of the AS exposed to the landfill leachate (KPL) originated from the bottom sediments of the Kalina pond in Świętochłowice (Poland). In order to develop an effective bioaugmentation strategy, the catabolic abilities of microorganisms recently isolated from the environment as well as bacterial strains already known as degraders of various aromatic compounds were characterized. The procedure for selecting attractive candidates for inoculating the AS co-treated with the KPL along with municipal effluents, included the following specific goals: (1) screening the catabolic traits of selected bacterial strains, (2) determining the acute toxicity of the KPL for the tested bacteria, (3) evaluating the ability of the bacteria to survive and remain in the AS, (4) gauging the capability of the bacteria to produce substances that facilitate the degradation of the contaminants, (5) establishing the relationships between the factors being studied and selecting the most efficient candidates for bioaugmentation, and finally (6) exploring the whole genomes of the best candidates for the presence of the genes that are associated with the degradation of pollutants and other features that enable them to acclimatize in the AS.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Strains

In this study, 10 bacterial strains were tested for their suitability for bioaugmentation of the AS. Three of them were purchased from the VTT Culture Collection in Espoo (Finland) and the Polish Collection of Microorganisms in the Ludwig Hirsztfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy in Wrocław (Poland) (PCM), while seven strains came from the Microbial Culture Collection in the Institute of Biology, Biotechnology, and Environmental Protection, Faculty of Natural Sciences, University of Silesia in Katowice (Poland) (IBBEP) (Table 1). The degradative potential of six strains: *Planococcus* sp. S5, *Stenotrophomonas maltophilia* KB2, *Pseudomonas putida* N6, *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas putida* mt-2, and *Pseudomonas fluorescens* towards a variety of organic compounds has previously been reported in the literature [36–38], whereas four strains: *Pseudomonas putida* OR45a, *Pseudomonas putida* KB3, *Glutamicibacter soli* OR45b, and *Rhodococcus erythropolis* KB4 have only recently been isolated from the environment and are presented here for the first time.

Table 1. Microorganisms selected for bioaugmentation of the activated sludge (AS) in the combined treatment of municipal wastewater and landfill leachate.

Bacterial Strain	Site of Isolation	Selection Factor	Source
<i>Pseudomonas putida</i> OR45a	AS loaded with refinery wastewater, Jedlicze, Poland	Styrene	IBBEP
<i>Glutamicibacter soli</i> OR45b	AS loaded with refinery wastewater, Jedlicze, Poland	Styrene	IBBEP
<i>Planococcus</i> sp. S5	AS loaded with municipal wastewater, Miechowice Bytom, Poland	Sodium salicylate	IBBEP
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> KB2	AS loaded with municipal wastewater, Miechowice Bytom, Poland	Phenol	IBBEP
<i>Pseudomonas putida</i> N6	AS loaded with municipal wastewater from a furniture factory, Jasienica Poland	Phenol	IBBEP
<i>Pseudomonas putida</i> KB3	Uncontaminated, agricultural soil, Siewierz, Poland	Phenol + 4-chlorophenol + 2,4-dichlorophenol Phenol + 4-chlorophenol + 2,4-dichlorophenol	IBBEP
<i>Rhodococcus erythropolis</i> KB4	Uncontaminated, agricultural soil, Siewierz, Poland	Phenol + 4-chlorophenol + 2,4-dichlorophenol Phenol + 4-chlorophenol + 2,4-dichlorophenol	IBBEP
<i>Pseudomonas</i> sp. (VTT E-93486)	AS from a peat biofilter bed	Styrene	VTT
<i>Pseudomonas putida</i> mt-2 (VTT E-022150)	nd	nd	VTT
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (PCM 2123)	nd	nd	PCM

IBBEP—Culture Collection in the Institute of Biology, Biotechnology, and Environmental Protection at the University of Silesia in Katowice (Poland), PCM—Culture Collection in the Ludwig Hirsztfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy in Wrocław (Poland), VTT—Culture Collection in Espoo (Finland), nd—data not available.

2.2. Isolating the Bacteria from the AS and Soil

The bacterial strains from the AS that was loaded with the refinery wastewater (Jedlicze, Poland) and the uncontaminated agricultural soil (Siewierz, Poland) were isolated using the classical enrichment technique [39] with a mineral salts medium (MSM) (Table S1) and 25 µg/mL of styrene, a combination of 100 µg/mL of phenol with 50 µg/mL of 4-chlorophenol or 10 µg/mL of 2,4-dichlorophenol, 50 µg/mL of 4-chlorophenol, or 10 µg/mL of 2,4-dichlorophenol as the selection factors, respectively.

2.3. Sample Collection

The landfill leachate (KPL) was obtained from the bottom sediments of the Kalina Pond in Świętochłowice (Upper Silesia, Poland), which is the site for the arbitrary disposal of industrial and municipal waste. The sediment samples were collected at the point at which the effluents from the waste dump entered the pond at a distance of 2 m from the shore and at a depth of 2 m in compliance with ISO 5667-13:2011 [40] and ISO 19458:2007P [41] in July 2017. The KPL was characterised by high concentrations of organic and inorganic pollutants and had an alkaline pH as well [19].

The activated sludge (AS) inoculum was obtained directly from the aeration tank of the wastewater treatment plant (WWTP) “Klimzowiec” (Chorzów, Poland).

2.4. Evaluating Catabolic Traits of the Bacterial Strains

The capability of bacterial strains to degrade phenol, 2-methylphenol, 3-methylphenol, 4-methylphenol, 4-aminophenol, catechol, 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, and sodium benzoate at different concentration ranges was studied using Biolog[®]MT plates (Biolog, Inc., Hayward, CA, USA). The data were collected using Microlog 4.01 software. The reduction of colorless 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) to a purple 1,3,5-triphenyltetrazolium formazan (TPF), which was measured as the color development in the wells (WCD), indicated that the substrate had been used as the sole carbon and energy source by the tested bacteria, whereas no color development indicated that it had not been utilized. The metabolic versatility (MV) of each strain was expressed as the ratio of the number of substrates that were metabolized by the bacterial cells to all of the tested hydrocarbons. The capacity of the bacteria to degrade the aromatic compounds (AC-USE) in the Biolog[®]TM plates was calculated as follows (1):

$$AC - USE = \frac{WCD}{t_{cp}} \quad (1)$$

where: t_{cp} —time at which the value curve plateau of the WCD was reached.

2.5. Acute Toxicity of the KPL

The toxic effect of the KPL on selected bacteria that were grown in the synthetic wastewater (SW) contaminated with the leachate in a concentration range from 0% to 12.5% was determined according to Michalska et al. [19]. The initial optical density (OD_{600}) of each bacterial strain was 0.1.

2.6. Evaluating the Auto-Aggregation and Co-Aggregation Ability of the Bacteria

The ability of the bacterial strains to auto-aggregate and co-aggregate with the indigenous microorganisms in the AS were determined by the modified method as described by Malik et al. [42]. Briefly, equal volumes of co-aggregating partners ($OD_{660} = 1.0$) including the cell suspensions of each bacterial strain and the microorganisms released from the AS in phosphate buffered saline (PBS) (Table S1) were mixed together and incubated at 23 ± 2 °C for 24 h with shaking at 130 rpm. Cell suspensions of pure bacterial strains were incubated under similar conditions in order to investigate their ability to auto-aggregate. Subsequently, the samples were allowed to settle and the OD_{660} of the supernatant was measured. The auto-aggregation (AAI) and co-aggregation (CAI) indices were calculated as follows (2):

$$AAI (CAI), \% = \frac{OD_{660i} - OD_{660s}}{OD_{660i}} \times 100\% \quad (2)$$

where: OD_{660i} —initial absorbance of the bacterial cell suspension, OD_{660s} —absorbance of the supernatant.

2.7. Determining the Flocculation Activity Index (FAI)

The flocculating activity of a bioflocculant produced by the bacterial strains was measured as the turbidity of a kaolin-clay suspension and determined in accordance with the methods of Kurane et al. [43] and Zhang et al. [44]. The flocculating activity index (FAI) was calculated according to the following Equation (3):

$$\text{FAI, \%} = \frac{A_{550\text{S}} - A_{550\text{C}}}{A_{550\text{S}}} \times 100\% \quad (3)$$

where: $A_{550\text{S}}$ —absorbance of the clarifying solution after the bioflocculant was added, $A_{550\text{C}}$ —absorbance of the clarifying solution after the fresh culture medium was added (control).

2.8. Measuring the Hydrophobicity of the Bacterial Cell Surface and the AS

The cell surface hydrophobicity (CSH) of the bacterial strains and the suspension of microorganisms released from the AS flocs was determined using a microbial adhesion to hydrocarbons (MATH) assay, according to the method described by Kos et al. [45]. For this purpose, microorganisms were grown in Luria–Bertani medium (LBB) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) uncontaminated or polluted with 3.5% and 5.5% of the KPL at 23 ± 2 °C for 24 h. After incubation, the microbial cells were harvested by centrifugation at 4 °C for 10 min at $5000 \times g$, washed twice with sterile 0.85% NaCl and resuspended in it. The CSH was quantified by calculating the percentage of bacterial cells that were transferred to the *p*-xylene phase, according to the following Equation (4):

$$\text{CSH, \%} = \frac{1 - \text{OD}_{660\text{i}}}{\text{OD}_{660\text{a}}} \times 100\% \quad (4)$$

where: $\text{OD}_{660\text{i}}$ —initial absorbance of the bacterial cell suspension, $\text{OD}_{660\text{a}}$ —absorbance of the aqueous phase, which was measured after 20 min of the incubation of the bacteria with *p*-xylene.

2.9. Qualitatively Assessing the N-Acyl Homoserine Lactone Signal Molecules and Exopolysaccharide Production

The production of the N-acyl homoserine lactone signal molecules (N-AHLs) was evaluated qualitatively only for the gram-negative bacteria using the colorimetric method of Taghadosi et al. [46]. The presence of lactone compounds was indicated by a dark brown color, however, the appearance of a yellow color indicated a lack of N-AHLs in the sample.

The production of exopolysaccharides (EPS) was qualitatively assessed by cultivating the bacterial strains on Congo red agar (CRA) using the method modified by Freeman et al. [47]. The strains that formed reddish black colonies with a rough, dry and crystalline consistency were considered to be EPS-producers.

2.10. Detecting the Bacterial Motility and Chemotaxis

The swimming and swarming motilities of the bioaugmentation candidates were assayed on semi-solid agar plates according to Déziel et al. [48]. In order to determine the chemotactic response of the bacteria towards the KPL, the semi-solid agar plates were additionally supplemented with 3.5% and 5.5% of the KPL. Motility was assayed quantitatively by measuring the size of the turbid zone formed by bacterial cells migrating away from the inoculation point.

2.11. Qualitatively Screening the Biosurfactant Production and Determining the Emulsification Index

The bacterial strains were studied for the production of biosurfactants using the CTAB/methylene blue agar test [49]. A spot of bacterial culture, which had been grown overnight in an LBB medium contaminated with 5.5% of the KPL was placed on a modified mineral salts agar (MMSA) (Table S1) supplemented with 0.2 g/L of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) along with 0.005 g/L of methylene blue dye. After 48 h of incubation at 23 ± 2 °C, the appearance of a dark blue halo around the bacterial colonies indicated the presence of an extracellular glycolipid biosurfactant. The quality of the

biosurfactant was determined by measuring its emulsification capacity according to Pacwa-Płociniczak et al. [50]. The emulsification index (E_{24}) was determined as follows (6):

$$E_{24}, \% = \frac{H_e}{H_m} \times 100\% \quad (5)$$

where: H_e is the height of the emulsion layer and H_m is the total height of the mixture.

2.12. Qualitatively Assessing the Production of Siderophores

The production of siderophores by the tested strains was qualitatively assayed according to the protocol described by [51] using the blue indicator dye, chrome azurol S (CAS). The microorganisms that exhibited an orange halo after five days of incubation at 23 ± 2 °C were considered to be positive for the production of siderophores.

2.13. Determining the Non-Inhibitory Concentrations of Ions for the Bacteria

In order to estimate the resistance of the bacteria to heavy metals and ammonium, the non-inhibitory concentrations (NIC) of selected ions were determined. The assays were performed using 96-well microtiter plates. Briefly, a solution of Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Cr^{6+} , and Pb^{2+} derived from $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, ZnSO_4 , $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, and $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ were introduced into the wells to obtain a final concentration of 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, whereas NH_4^+ was introduced to obtain a final concentration of 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Subsequently, bacterial suspensions (optical density at 590 nm = 0.1) were inoculated into the wells contained the appropriate concentration of each ion. After 24 h of incubation in the dark at 23 ± 2 °C, the absorbance in each well was measured at a wavelength of 590 nm using a Biolog[®] Microstation[™] (BIOLOG Inc., Hayward, CA, USA). The maximum concentration of ions that did not inhibit bacterial growth was considered to be the NIC value.

2.14. Whole Genome Sequencing of *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3

The whole genomes of *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3, which had been selected as prospective candidates for bioaugmentation of the AS loaded with the KPL, were sequenced. The bacterial cells were maintained in a pure culture in an aerobic lysogeny broth at 23 ± 2 °C prior to the DNA extraction using a GeneMATRIX Bacterial and Yeast Genomic DNA Purification Kit (Eurx, Gdańsk, Poland). The genome sequencing was performed with MicrobesNG [52] using the Illumina MiSeq platform with 2×250 -bp paired-end reads. The results of the sequencing were put through a standard MicrobesNG analysis pipeline and deposited in the GenBank database under the following accession numbers: SPUU00000000.1 for *P. putida* OR45a and SPUT00000000.1 for *P. putida* KB3.

The functional annotation of both strains was performed using an eggNOG-mapper 1.0.3-35 with a one-to-one orthology restriction [53]. The genes that were assigned to multiple COG (clusters of orthologous groups) categories were counted as being present in each of these categories. The KO tags were mapped to the KEGG pathways using the Search Pathway tool from the collection of KEGG Mapper tools, which permit the genes involved in degrading xenobiotics to be visualized. The antibacterial biocide and metal resistance protein sequences were retrieved from the BacMet experimentally confirmed resistance genes database [54,55]. The proteome sequences of both strains were aligned with the BacMet database sequences using the BLAST algorithm and only the sequences with a coverage and identity more than 90% were considered to be relevant matches [56].

In order to generate a phylogenetic tree of the 13 high-quality bacterial genomes, the 31 single-copy housekeeping genes were retrieved from each genome using AmphoraNet [57]. The sequences of each individual marker gene were aligned using Geneious (version 11.1.2) (Biomatters Ltd., Auckland CBD, New Zealand) with the default parameters and the poorly aligned positions were removed using Gblocks (version 0.91b) (Integrated DNA Technologies, Iowa, IA, USA). Subsequently, the alignments were concatenated and a maximum likelihood phylogenetic tree was created in MEGA (version 7.0.26) (Pennsylvania State University, Mueller Laboratory, University Park, PA, USA). In order to assess

the support of the phylogenetic tree, a bootstrap test with 1000 replications was performed. Finally, the phylogenetic tree was visualized using the Interactive Tree of Life tool (iTOL) [58], which is available at [59].

2.15. Statistical Analysis

All of the data presented in this paper are expressed as the mean and standard deviation and were analysed using Microsoft Office Excel 2010, Statistica® 12.5 PL (StatSoft® Inc., Tulsa, OK, USA) and GraphPad Prism 5 software (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA). For the matrix visualization and for the scrutiny of bioaugmentation potential of the tested bacteria, all of the data were first subjected to a min-max normalization according to the equation:

$$ND = \frac{RD_i - RD_{min}}{RD_{max} - RD_{min}} \quad (6)$$

where: ND (normalized data)—all of the variables that had scaled to the range (0, 1), RD_i —the initial raw data, RD_{min} —the minimal value of each parameter in a data set, RD_{max} —the maximal value of each parameter in a data set.

Qualitatively assayed characteristics of the tested bacteria were normalized as follows: the lack of bacterial ability to synthesize biosurfactants, siderophores, and exopolysaccharides was considered as 0, whereas the aptitude of bacteria to produce these compounds was considered as 1.

Any changes between the microorganisms were determined using a one-way analysis of variance (ANOVA, post-hoc test) and were followed by the separation of the treatments from the control as well as the microorganisms among them by applying the post-hoc LSD at confidence intervals of 95% ($p < 0.05$). The values that are indicated by different lower case letters were statistically significant.

3. Results

3.1. The Catabolic Potential of the Tested Bacteria and Their Ability to Grow in the Presence of the KPL

The degradative capacity of the potential candidates for bioaugmentation of the AS, which were analyzed using Biolog®^{MT} plates, revealed that the metabolic versatility of the tested bacteria can be ordered as follows: *P. putida* OR45a > *P. putida* KB3 = *P. putida* N6 = *S. maltophilia* KB2 > *P. putida* sp. > *Planococcus* sp. S5 = *G. soli* OR45b = *P. putida* mt-2 > *R. erythropolis* KB4 > *P. fluorescens* (Figure 1). Of all of the tested strains, *P. putida* OR45a was characterized by the highest degree of metabolic versatility (0.28) and was the only strain able to degrade 3-methylphenol. In addition to this compound, it utilized seven other aromatic compounds as its sole carbon and energy source including phenol, 2-methylphenol, benzoic acid, and 4-hydroxybenzoic acid (up to 1000 µg/mL), 4-methylphenol and catechol (up to 750 µg/mL) as well as 3,4-dihydroxybenzoic acid (up to 250 µg/mL). *P. putida* KB3, *P. putida* N6, and *S. maltophilia* KB2, which had a metabolic versatility of 0.24, proved to be equally promising strains for degrading aromatic compounds. Conversely, *P. fluorescens* did not display any capacity for degrading the tested aromatic compounds.

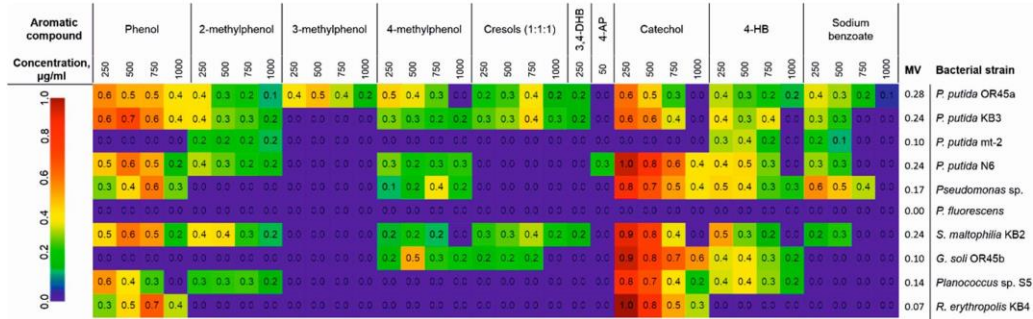


Figure 1. Analysis of the metabolic versatility (MV) of the candidates for bioaugmentation using Biolog[®] MT plates. All of the data values were normalized and are presented as a color scale from navy blue (0) to red (1), which refer to inability and biodegradability of the tested aromatic compounds, respectively.

Previous studies have shown that exposing the AS to the KPL in wastewater at a concentration of 11.26% resulted in the complete inhibition of visible growth of microorganisms [20]. Taking this into account, in this study, a concentration range of 0.5% to 12.5% was used to investigate the ability of the bacterial strains to grow in the presence of the KPL in the effluent. The results are presented as the percentage of the stimulation or inhibition of bacterial growth (Figure 2). Although the increase in the KPL concentration in the SW was correlated with the increase of the effluent toxicity, the toxic effect varied in relation to the investigated microorganisms. It was found that at concentrations of 0.5 and 1.5%, the KPL in the SW stimulated the growth of *P. putida* OR45a, *P. putida* sp. and *Planococcus* sp. S5. By contrast, the addition of 1.5% of the KPL into the effluent resulted in the mortality of the other bacteria. Among the tested strains, *P. putida* OR45a proved to be the most resistant to the toxic effect of the KPL. The exposure of this bacterium to the KPL at a concentration of 12.5%, which was allocated to the 100% mortality of the AS microorganisms, merely resulted in the inhibition of the growth of *P. putida* OR45a by 28%. Generally, the toxicity of the KPL towards the tested bacteria can be ordered as follows: *P. putida* OR45a < *P. putida* sp. < *P. putida* mt-2 < *P. fluorescens* < *P. putida* KB3 < *P. putida* KB2 < *Planococcus* sp. S5 < *P. putida* N6 < *G. soli* OR45b < AS < *R. erythropolis* KB4.

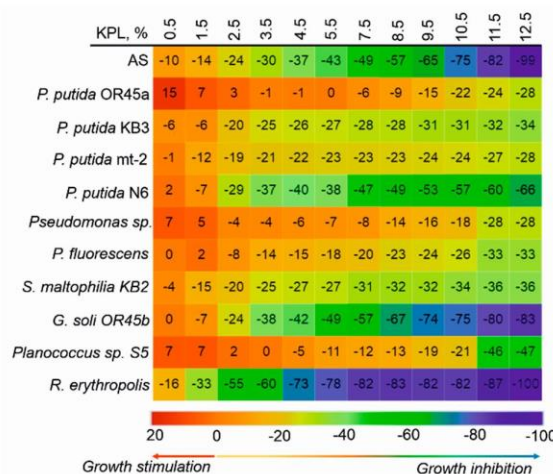


Figure 2. Effect of the different concentrations of the Kalina pond leachate (KPL) on the growth of the tested bacteria. The negative values indicate the inhibition of microbial growth whereas the positive values indicate its stimulation.

3.2. Ability of Bacterial Strains to Incorporate into the AS Structure

Aggregation and flocculation properties were important factors that promoted the survival of the inoculated strains in the AS. The results obtained in this study showed that although all of the tested bacteria were self-aggregating, *Pseudomonas* sp. had the strongest ability to form auto-aggregates (Figure 3). However, the strong auto-aggregation ability (AAI = 0.61%) of this bacterium did not support its co-aggregation with the microorganisms from the AS (CAI = 0%). Screening of the bacteria with co-aggregation ability revealed that only *P. putida* OR45a was able to co-aggregate with multiple species from the AS at a high co-aggregation rate of 63%. Moreover, this bacterium exhibited a good auto-aggregation (AAI = 46%). *P. putida* KB3 and *G. soli* OR45b can be categorized as both good auto- and co-aggregating strains, whereas *S. maltophilia* KB2, *R. erythropolis* KB4, *Planococcus* sp. S5, and *P. putida* N6 had a weak or very weak ability to aggregate.

An analysis of the bioflocculant-producing bacteria showed that eight of the evaluated strains including *P. putida* OR45a, *P. putida* mt-2, *Planococcus* sp. S5, *Pseudomonas* sp., *S. maltophilia* KB2, *P. putida* KB3, and *G. soli* OR45a exhibited promising flocculating activity of 70%, 59%, 51%, 50%, 46%, 46%, and 35%, respectively. Conversely, *R. erythropolis* KB4 and *P. putida* N6 were characterized as having a weak bioflocculant-producing ability (Figure 3).

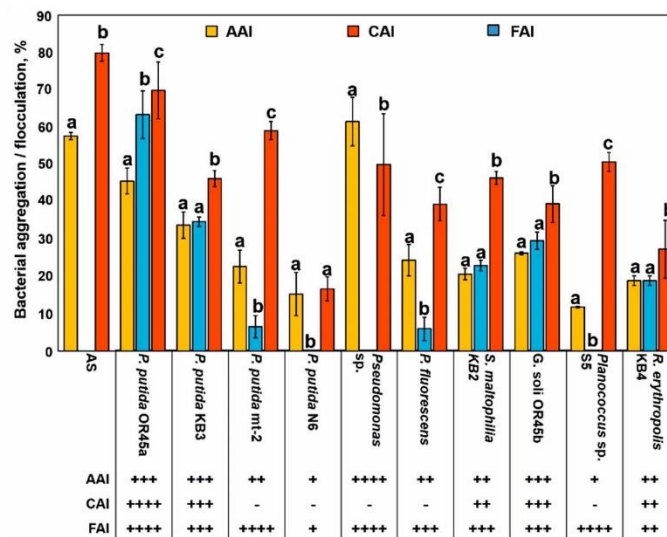


Figure 3. Analysis of the ability of the tested strains to incorporate into the AS floc structure. AAI—auto-aggregation index, CAI—co-aggregation index, FAI—bio-flocculation index, (++++) strong ability, (+++) good ability, (++) weak ability, (+) very weak ability, (–) lack of ability.

The auto- and co-aggregation abilities of the investigated Gram-negative bacteria can also be enhanced by the production of N-AHLs and exopolysaccharides. It has been demonstrated that only *P. putida* N6, which exhibited very weak aggregation properties, can be regarded as a non-N-AHLs-producing strain. In turn, *P. putida* OR45a, *P. putida* KB3, *P. putida* mt-2, *P. fluorescens*, *Planococcus* sp. S5, and *S. maltophilia* KB2 were able to produce exopolysaccharides (Table 2).

Table 2. Production of N-AHLs and exopolysaccharides by the tested strains.

Characteristics Bacterial Strain	Capabilities Supporting Incorporation into the AS	
	N-AHLs	Exopolysaccharides
<i>P. putida</i> OR45a	+	+
<i>P. putida</i> KB3	+	+
<i>P. putida</i> mt-2 (VTT E-022150)	+	+
<i>P. putida</i> N6	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (VTT E-93486)	+	–
<i>P. fluorescens</i> (PCM 2123)	+	+
<i>S. maltophilia</i> KB2	+	+
<i>G. soli</i> OR45b	nd	–
<i>Planococcus</i> sp. S5	nd	+
<i>R. erythropolis</i> KB4	nd	–

(+) production of N-AHLs/exopolysaccharides, (–) lack of production, nd—not determined.

3.3. Biosurfactant and Siderophore Production by the Bacterial Strains

All of the bacterial strains were also screened for a high biosurfactant-producing activity. The screening was performed against the qualitative (CTAB/methylene blue agar test) and semi-quantitative (emulsification index) parameters. Five bacterial strains were able to produce dark blue halos around the colonies, which indicated that they were biosurfactant-producers. The emulsification indices measured for these strains demonstrated that the *p*-xylene was emulsified by *P. putida* OR45a, *P. putida* KB3, *S. maltophilia* KB2, *P. putida* mt-2, and *P. fluorescens* to a level of 57%, 49%, 27%, 21%, and 16%, respectively (Table 3). Another metabolic capability of the tested bacteria, which can be harnessed for wastewater bioremediation, was the production of siderophores. Five of the microorganisms screened for the production of these compounds grew on CAS agar and changed its color from blue to orange with different intensities of the halo formed, which could be related to the concentration of siderophores (Table 3).

Table 3. Biosurfactant production, emulsification index, and siderophore production by the tested strains.

Characteristics Bacterial Strain	Capabilities Supporting the Degradation of Pollutants in Wastewater		
	Biosurfactant Production	Emulsification Index (E ₂₄), %	Siderophore Production
<i>P. putida</i> OR45a	+	57 ± 8	+
<i>P. putida</i> KB3	+	49 ± 3	+
<i>P. putida</i> mt-2 (VTT E-022150)	+	27 ± 5	–
<i>P. putida</i> N6	–	nd	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (VTT E-93486)	–	nd	+
<i>P. fluorescens</i> (PCM 2123)	+	16 ± 7	+
<i>S. maltophilia</i> KB2	+	21 ± 3	+
<i>G. soli</i> OR45b	–	nd	–
<i>Planococcus</i> sp. S5	–	nd	–
<i>R. erythropolis</i> KB4	–	nd	–

(+) capability of biosurfactant/siderophore production, (–) lack of capability, nd—not determined.

3.4. Cell Surface Hydrophobicity (CSH) of the Bacterial Strains and the AS

The CSH plays an indispensable role in the flocculation process and in the adhesion of bacteria to the flocs. The results of this study showed that the tested strains varied in the CSH from 13 to 72% (Figure 4). The cells of *P. fluorescens*, *P. putida* OR45a, *P. putida* mt-2, *S. maltophilia* KB2, and *P. putida* KB3 were highly hydrophobic (CSH ≥ 50%), while the cells of *G. soli* OR45b and *R. erythropolis* KB4 were characterized by a low hydrophobicity. By contrast, the cells of *P. putida* N6, *Planococcus* sp. S5, and *P. putida* sp. can be considered to be hydrophilic due to their low hydrophobicity values of 18%, 15%, and 13%, respectively.

In a parallel experiment, the influence of the KPL on the CSH of the tested bacterial strains and the overall hydrophobicity of the microorganisms that had been derived from the AS were examined. As is shown in Figure 4, the KPL affected the cell surface properties of the investigated microorganisms differentially. Incubating the AS-derived bacteria with 3.5% and 5.5% of the KPL decreased their overall hydrophobicity markedly from 57% to 22% and 6%, respectively. Cultivating *G. soli* OR45b, *P. fluorescens*, *S. maltophilia* KB2, and *Pseudomonas* sp. in the presence of 3.5% of the KPL resulted in a decrease of their CSH by 3%, 19%, 38%, and 100%, respectively. What is more, the CSH of *P. fluorescens*, *S. maltophilia* KB2, and *G. soli* OR45b was noted to decrease even more in response to the addition of 5.5% of the pollutant by 33%, 53%, and 93%. On the other hand, the KPL strongly promoted an increase in the hydrophobicity of *P. putida* OR45a from 63% to 85% and changed the cell character of *Planococcus* sp. S5 to being more hydrophobic.

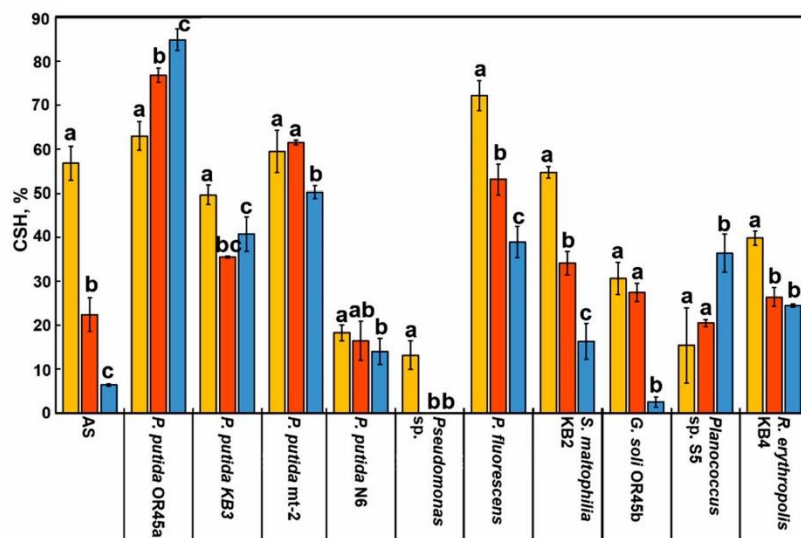


Figure 4. Effect of the KPL on the cell surface hydrophobicity (CSH) of the tested bacterial strains and the overall hydrophobicity of microorganisms derived from the AS.

3.5. Bacterial Motility and Chemotaxis

Motility plays an important role in the microbial functions and processes that are connected with the survival of microorganisms in adverse conditions. Here, all of the tested strains were able to undertake both of the flagellum-mediated types of motility—swimming and swarming (Figure 5). However, among the tested microorganisms, *G. soli* OR45b and *P. putida* N6 were the strains with the weakest ability to move. The *P. putida* OR45a, *P. putida* mt-2, *Planococcus* sp. S5, and *R. erythropolis* KB4 strains had a stronger swimming tendency than *P. putida* KB3, *S. maltophilia* KB2, and *P. fluorescens*, which exhibited a strong swarming propensity.

The adaptation of the tested strains to the presence of the KPL was evaluated by analyzing their chemotactic responses. As Figure 5 shows, the swimming and swarming motility of the tested bacteria were markedly altered in the presence of the KPL. Addition of 3.5% and 5.5% of the KPL into the agar plates had a strong inhibitory effect on the swarming phenotype of almost all of the microorganisms that were investigated, except for *P. putida* mt-2 whose swarming ability was promoted by the presence of the KPL. Further observation revealed that *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp., *P. putida* KB3, *S. maltophilia* KB2, and *P. putida* OR45b completely lost their chemotactic swarming responses to the KPL. Interestingly, the KPL did not block the swimming motility of any of the bacterial strains. This study revealed that the KPL increased the swimming motility of *P. putida* OR45a, *G. soli* OR45b,

Pseudomonas sp., *P. putida* KB3, *P. fluorescens*, and *S. maltophilia* KB2 by 16%, 43%, 45%, 72%, 250%, and 288%, respectively.

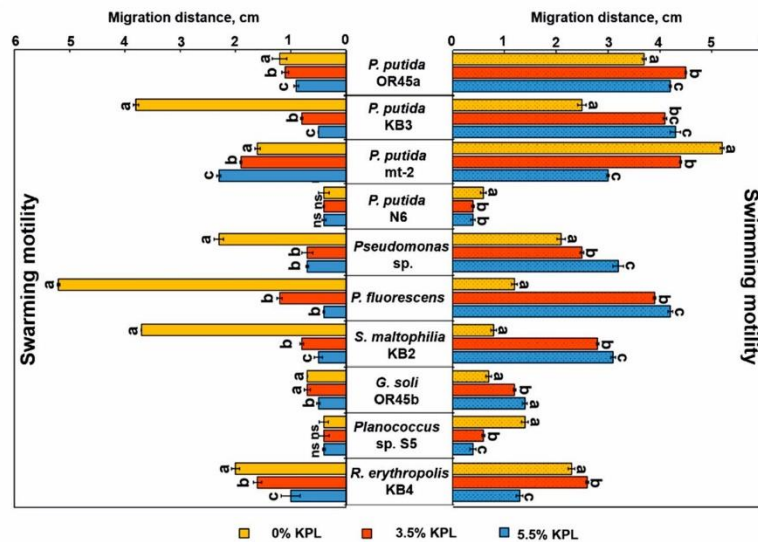


Figure 5. Motility behavior of the tested strains in response to the KPL.

3.6. Selecting the Most Promising Candidates for Bioaugmentation

The robust candidates for bioaugmentation of the AS were selected based on a multifaceted approach that included an analysis of their metabolic versatility (degradative potential towards phenolic compounds, growth in the presence of the KPL), their ability to biodegrade contaminants (production of biosurfactants, siderophores, changes in the cell surface hydrophobicity, chemotaxis) and the features that supported their survival and incorporation into the AS flocs (auto-aggregation, co-aggregation, bioflocculation, exopolysaccharide production). An analysis of the crucial features of the bacteria to successfully bioaugment the AS revealed that *P. putida* OR45a, *P. putida* KB3, and *S. maltophilia* KB2 proved to be the most effective candidates for bioaugmentation of the AS in order to improve the aerobic treatment of the KPL (Figure 6). Although these bacteria had a similar metabolic capacity and ability to degrade xenobiotics, among them *P. putida* OR45a had the strongest metabolic potential and aptitude to incorporate into the AS. The results also indicated that *G. soli* OR45b, *R. erythropolis* KB4, *Planococcus* sp. S5, *P. putida* N6, and *Pseudomonas* sp. were not suitable for bioaugmentation due to the lack of their overall ability to enhance contaminant biodegradation and their low ability to survive in the sludge environment. Among the tested bacteria, *R. erythropolis* KB4 and *G. soli* OR45b had the lowest metabolic capacity. Nevertheless, these bacteria may be considered to be used as supportive agents during the construction of a microbial consortium because they had properties that enabled them to thrive in the AS. Finally, *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3, which had the highest overall bioaugmentation capacity, were selected for the further analyses.

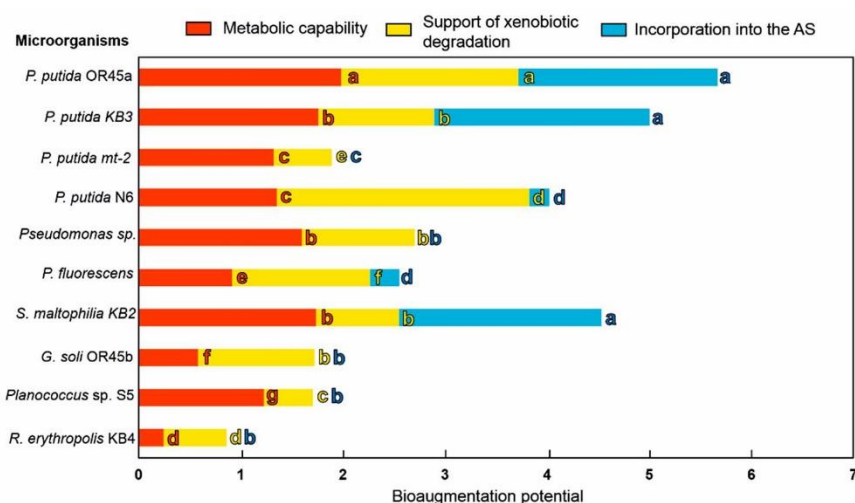


Figure 6. Comparison of the bioaugmentation potential of the tested bacterial strains.

3.7. Non-Inhibitory Concentration (NIC) of the Selected Ions for *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3

Contamination of wastewater with organic compounds is often accompanied by pollution with heavy metals. Microorganisms with strong degradation capabilities that are also resistant to heavy metals are at the forefront of the candidates for bioaugmentation. Here, the resistance of *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 towards selected heavy metals (Zn, Cu, Cd, Ba, Cr, Pb), which are frequently present in sewage, were observed (Table 4). The trends in the toxicity of heavy metals for *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 were in the order of Cr > Cd > Zn > Cu > Pb > Ba and Cr > Pb > Cd > Zn > Cu > Ba, respectively.

Table 4. The non-inhibitory concentration (NIC) of the selected ions for *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3.

Ions	NIC, µg/mL	
	<i>P. putida</i> OR45a	<i>P. putida</i> KB3
Zn ²⁺	80.68 ± 2.50	81.15 ± 2.99
Cu ²⁺	128.43 ± 19.90	104.15 ± 3.56
Cd ²⁺	52.13 ± 2.48	59.97 ± 13.49
Ba ²⁺	172.63 ± 2.94	224.65 ± 11.58
Cr ⁶⁺	8.30 ± 0.59	11.30 ± 1.38
Pb ²⁺	150.00 ± 1.29	50.00 ± 0.01
NH ₃ -N	600.00 ± 52.30	900.00 ± 86.40

3.8. Genome-Guided Exploration of *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3

The newly sequenced 5,993,405 bp and 5,772,482 bp genomes of *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 were assembled into 165 and 185 contigs with an average G + C content of 61.3% and 61.7%, respectively (Table S2). A total of 5433 protein encoding genes in *P. putida* OR45a and 5188 protein encoding genes in *P. putida* KB3 were classified into the appropriate clusters of orthologous groups (COG) categories in 21 functional categories (Table S3). More than 35% of all of the predicted genes in both genomes were assigned COG numbers that are associated with cellular metabolism. The largest fraction of the predicted genes was assigned as encoding proteins involved in amino acid transport and metabolism (E category) followed by genes encoding proteins involved in inorganic ion transport (P category) and genes encoding proteins involved in metabolism and energy production and conversion (C category). Specifically, the number of genes participating in cellular processing and signaling as well as information storage and processing were about 17% independent of the candidate for bioaugmentation. The protein

families for which the biological functions remain unknown constituted 18% and 19% of the genomes of *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3, respectively.

A scrutiny of the genomes of *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 allowed the genes encoding enzymes of aromatic hydrocarbon degradation pathways to be identified. Locations of catabolic genes identified in these *Pseudomonas* strains in the general metabolic pathway of degradation of aromatic compounds by bacteria are illustrated in Figures 7 and 8, respectively. An exploration of both genomes revealed the presence of gene cluster *dmpKLMNOP*, which encodes multi-component phenol 2-monoxygenase, which is responsible for the cleavage pathway of (methyl)phenols (Table S4). Moreover, both strains contained the *dmpB*, *dmpC*, and *dmpD* genes, which encode catechol 2,3-dioxygenase, 2-hydroxyomuonic semi-aldehyde dehydrogenase, and 2-hydroxyomuonic semi-aldehyde hydrolase, respectively, involved in the meta-cleavage pathway of aromatic compounds. In addition, the *catA*, *catB*, and *catC* genes encoding enzymes that are implicated in the meta-cleavage pathway, were also identified in the genomes of the bacteria. It was inferred that tested bacteria harboured gene cluster *benABCD* encoding a three-component benzoate 1,2-dioxygenase and 1,6-dihydroxycyclohexa-2,4-diene-1-carboxylate dehydrogenase, which are involved in the transformation of benzoate into catechol. Moreover, this region also harbored the *pcaDIJ* and *catABC* genes encoding the enzymes for the catechol branch of the β -ketoacid pathway, which yields succinyl-CoA and acetyl-CoA, as well as the *pcaHGB* genes for the protocatechuate branch of the β -ketoacid pathway, which enables the degradation of hydroxybenzoate. It is noteworthy that both bacterial strains may be able to degrade nitroalkane compounds due to the presence of the gene cluster *npd*, which encodes 2-nitropropane dioxygenase, in their genomes.

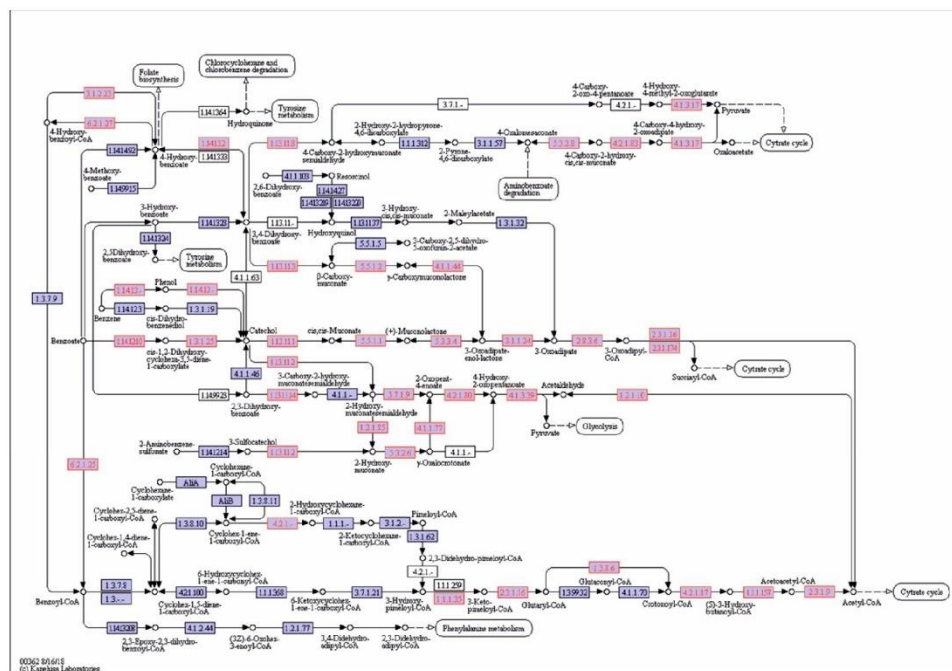


Figure 7. Locations of catabolic genes identified in *P. putida* OR45a (marked in pink) in the general microbial metabolic pathway for degradation of aromatic compounds.

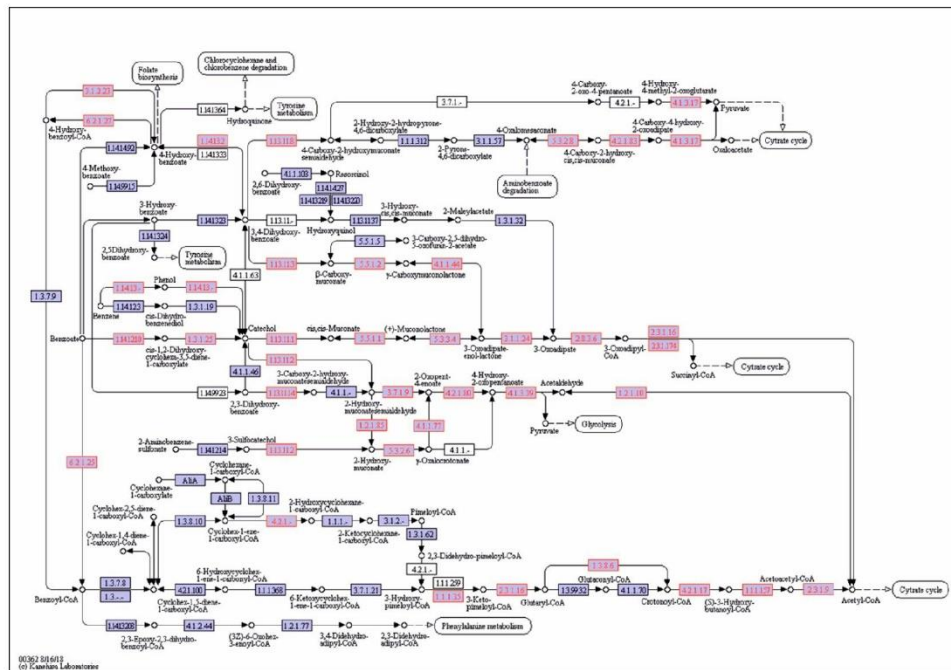


Figure 8. Locations of catabolic genes identified in *P. putida* KB3 (marked in pink) in the general microbial metabolic pathway for degradation of aromatic compounds.

The genes from the *P. putida* KB3 and *P. putida* OR45a genomes that are associated with biocide and metal resistance were mined using the BacMet database, which yielded 17 and 21 genes, respectively. The tolerance of *P. putida* KB3 to various solvents was proven by the presence of the *mepB* and *mepC* genes, which encode the inner and outer membrane multidrug/solvent efflux pump, respectively. The *mepBC* gene cluster contributes to the resistance to toluene, hexane, *p*-xylene as well as antibiotics such as ampicillin, penicillin G, erythromycin, novobiocin, and wycline. By contrast, no such gene cluster was found in *P. putida* OR45a. However, both of the tested strains were characterized by resistance to triclosan, *n*-hexane, and *p*-xylene due to the presence of the *mexE* and *mexF* genes, which encode the multidrug efflux RND membrane fusion protein and transporter, respectively. They also had the genes that are involved in the export of toluene, styrene, *m*-xylene, propylbenzene, and ethylbenzene. Moreover, the presence of the *oscA* and *chrR* genes in their genomes indicated a high degree of chromium(VI) resistance. It is also worth emphasizing that the genome of *P. putida* KB3 carried the *merAER* gene cluster, which is involved in mercury resistance.

The genomic-scale analysis of *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 revealed the presence of twelve genes (*algD*, *alg8*, *alg44*, *algK*, *algE*, *algG*, *algX*, *algL*, *algI*, *algJ*, *algF*, and *algA*) involved in the biosynthesis of alginate, which is a very common polysaccharide synthesized by *Pseudomonas* bacteria.

The phylogenetic relationships between *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 and other *Pseudomonas* strains, which were based on the concatenation of 31 single-copy genes were determined and are illustrated in Figure 9. The genome phylogeny with a 92% bootstrap support indicates that the *P. putida* OR45a and *P. putida* BIRD-1 strains [60] formed a monophyletic group or clade that also included, in a decreasing order of relevance, *P. putida* KT2440 [61] and *P. putida* KB3.

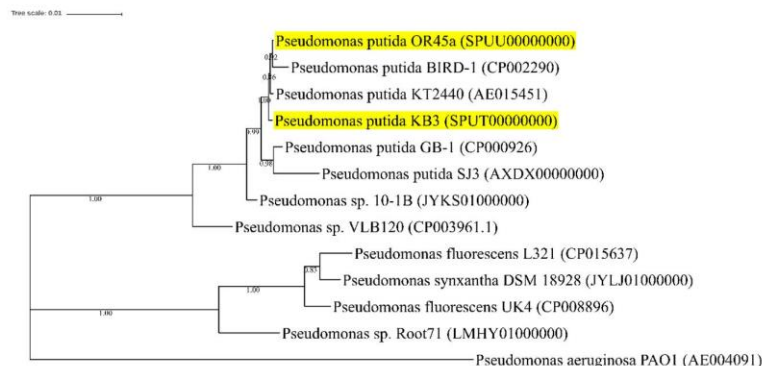


Figure 9. A maximum likelihood phylogenetic tree of the 13 *Pseudomonas* strains on the concatenation of 31 single-copy genes. *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 are indicated in yellow on the phylogenetic tree. The GenBank accession numbers are provided in the parentheses and the bootstrap support values are indicated on the nodes.

4. Discussion

In this study, 10 bacterial strains isolated from different matrices were tested for the various criteria that they should meet in order to be bioaugmented into the AS polluted with the KPL to enhance the removal efficiency of COD and improve the sludge quality. The catabolic performance of the investigated microorganisms was analyzed in the presence of selected phenolic compounds that have commonly been found in both municipal and industrial leachates as the main components of many manufactured products [62,63]. The obtained results showed that *P. putida* OR45a, *P. putida* KB3, *P. putida* N6, and *S. maltophilia* KB3 exhibited a considerable capability to degrade phenolic compounds, including catechol, benzoate, 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, phenol, 2-methylphenol, 4-methylphenol, and a mixture of cresol isomers. The microbial degradation of such compounds is possible due to the activity of iron-dependent oxygenases, which are responsible for opening the aromatic ring. The effective functioning of these enzymes can be improved by the secretion of siderophores, which increases the bioavailability of the iron ions (Fe^{3+}) from sparingly soluble substrates and environments with a low concentration of this element for bacterial cells [64]. Here, three of the bioaugmentation candidates, *P. putida* OR45a, *P. putida* KB3, and *S. maltophilia* KB2, which had a high degradative potential towards aromatic compounds were found to successfully overcome the iron limitation by excreting siderophores. The literature data revealed that siderophores not only play an important role in iron scavenging but may also influence the swimming motility of bacteria as well as their resistance to oxidative and aromatic stress [65]. In our study, the relationship between siderophore production and the ability to withstand high concentrations of the KPL in wastewater was confirmed for two strains—*P. fluorescens* and *Pseudomonas* sp.

Although the application of bioaugmentation in sewage treatment plants can succeed in removing specific toxic compounds, this strategy may fail to enhance the removal efficiency of total COD from wastewater polluted with the landfill leachate because it constitutes a mixture of inorganic and organic contaminants [66]. Therefore, the successful exploitation of bacteria in the bioremediation of wastewater should be supported by selecting strong and adaptable strains. In this study, high concentrations of the KPL (12.5%) caused the complete inhibition of the growth of *G. soli* OR45b, *R. erythropolis*, and *P. putida* N6 as well as the AS microbial populations. In contrast, *P. putida* OR45a, *P. putida* KB3, and *S. maltophilia* KB2 could withstand high concentrations of the KPL, and therefore, they could be promising candidates to treat the leachate in the AS.

The self-aggregation and co-aggregation among genetically identical and distinct bacteria are factors that are believed to play a crucial role in forming activated sludge flocs, which act as a barrier to their mass transfer and reduce the penetration of toxic compounds into the inner cells in the

AS [42,66]. Therefore, screening bacteria with such capabilities may have important significance in bioaugmentation treatment [67]. An example could be the research of Jiang et al. [68], who reported that the bioaugmentation of the AS with *Propioniferax*-like PG-02, which was capable of degrading phenol and *Comamonas* sp. PB-08, which had a strong aggregation ability resulted in the acceleration of phenol degradation and an improvement of the aerobic granulation. A similar cooperation between bacteria that were used to bioaugment the AS loaded with tetrahydrofuran was observed by [69]. Moreover, studies by Adav et al. [70] and Di Gioia [71] indicated that inoculated bacteria promoted the degradation efficiency of other bacteria via their co-aggregation but not via the introduction of any additional degradative potential. Another critical factor for the success of bioaugmentation is the compatibility of inoculated bacteria with the indigenous microorganisms in the AS. In this study, good auto-aggregation propensities were confirmed for *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3, which had a high potential to utilize phenol, and for *G. soli* OR45b and *Pseudomonas* sp., which had a poor phenol degradation capacity. Moreover, all of these strains manifested a good or even strong co-aggregation ability with the other microbial strains in the AS, which could mediate their integration into the sludge structure and thus improve the reactor efficiency.

An important feature for bacteria that are selected to bioaugment the AS is their ability to synthesize compounds referred as bioflocculants, which support cell aggregation and immobilization of the contaminants suspended in wastewater. The introduction of such microorganisms into the AS can accelerate sludge granulation and the formation of more stable flocs. This phenomenon was confirmed by Song et al. [72] who bioaugmented the AS with bacterial consortium composed of two bioflocculant-producing strains—*Devosia hwasunensis* and *Tetrasphaera elongata*. In another study, Guo et al. [73] showed that the bioflocculants synthesized by *Bacillus* sp. F2 and *Bacillus* sp. F6 contributed to the growth of the bacteria responsible for the cohesion of sludge flocs and improving the AS flocculation. In addition, bioflocculants can affect the removal of various contaminants in wastewater [74–76]. For example, a bioflocculant produced by *Bacillus salmalaya* 139SI in the treatment of the industrial wastewater resulted in a 99% removal of COD after treatment [77]. In other study, Zhang et al. [78] showed that the treatment of landfill leachate with wastewater using a microbial consortium composed of the bioflocculant-producing strains *Bacillus cereus* and *Pichia membranifaciens* enabled the removal of 73% of COD. In turn, Gomaa and El-Meihy [79] reported a great capacity of biosurfactant produced by *Citrobacter freundii* MG812314.1 to remove the heavy metals from wastewater. Our research revealed that two of the ten bioaugmentation candidates, namely *R. erythropolis* KB4 and *P. putida* N6, had weak bioflocculation properties. However, the other investigated microorganisms were characterized by good (39% to 49%) or strong (50% to 70%) flocculating capacities. This can suggest that the bioflocculation abilities of the bacterial strains presented in this study may support their resistance to the toxic compounds that are found in the KPL.

The capability of microorganisms to communicate with each other by sensing and responding to small signal molecules (auto-inductors), which is known as quorum sensing (QS), is very important during the selection of desirable bacteria for the AS bioaugmentation. The propensity of bacterial strains to secrete auto-inductors can support their intracellular communication with the autochthonous microorganisms in the AS and thus enable its effective settling. This phenomenon was studied by Wang et al. [80], who showed that the N-AHLs produced by *Acinetobacter* sp. TW, were responsible for protecting cells against the toxicity of industrial wastewater and enabled this bacterium to incorporate into the structure of the AS. Herein, among all of the tested gram-negative bacteria, only *P. putida* N6 did not produce N-AHLs, whereas the presence of this feature in other candidates confirmed their ability to incorporate into the AS flocs.

Another desirable feature of the bacteria that are used in the bioaugmentation strategy is their ability to produce exopolysaccharide substances (EPS). EPS are extremely important substances in mediating cell aggregation during the formation of activated sludge flocs, which determines the structure, charge and settleability of flocs [81]. The aggregation propensity of the bacteria inoculated into the AS not only mediates their communication with sludge autochthonous microorganisms but also

plays an important role in the bacterial defense against predators [82]. Furthermore, the hydrophobic regions and numerous anionic functional groups (e.g., carboxyl, phosphoryl, sulfhydryl, phenyl, and hydroxyl) present in the structure of EPS not only mediate the accumulation of nutrients but also bind the contaminants present in wastewater including heavy metals [83,84]. This was confirmed by Gupta and Thakur [85] who reported that the effectiveness of contaminant removal from wastewater inoculated with *Bacillus* sp. ISTVK1 was partially associated with its ability to produce a copious number of extracellular polymers. In this study, the ability of *P. putida* OR45a, *P. putida* KB3, *P. putida* mt-2, *P. fluorescens*, and *S. maltophilia* KB2 to produce EPS may support their resistance to the KPL in wastewater as well as help in the formation of larger and denser AS particles.

The formation and structure of the AS flocs are closely connected with the cell surface hydrophobicity (CSH). Previous research indicated that using microorganisms with a high CSH in the bioaugmentation of the AS accelerated the formation of sludge granules [70]. Moreover, it was found that along with an increase of microbial hydrophobicity, the cell–cell adhesion and aggregation also became stronger [86] and the removal of contaminants such as aromatic compounds, heavy metals, nitrogen, and phosphorus was accelerated [70]. In the present study, *P. putida* OR45a, *P. putida* KB3, *P. putida* mt-2, and *S. maltophilia* KB2 were categorized as the strains with the strongest hydrophobic properties (CSH above 50%). All of the tested bacteria had the ability to regulate CSH in order to adapt to the presence of the KPL in wastewater. However, for most of the strains, the reduction of their CSH was noted after addition of the KPL, which caused their membrane profile to become more hydrophilic. This phenomenon might be the result of diminishing the availability and permeability of bacterial cell wall to contaminants in the KPL in order to prevent pollutants from entering the cell [87]. However, two bacterial strains, *P. putida* OR45a and *Planococcus* sp. S5, significantly increased their CSH in the presence of the KPL, which may imply that they were capable of degrading the pollutants distributed in the KPL. Similarly, in the research of Wick et al. [88] the increase in cell hydrophobicity of *Mycobacterium frederiksborgense* after the addition of anthracene was attributed to its capability to utilize this compound as a carbon and energy source.

The hydrophobic character of the cells supports the uptake of the hydrophobic substrates from the environment without the production of surfactants, which predisposes their use in bioremediation technologies [89]. Because the microbial metabolism of xenobiotics could be impeded due to their hydrophobic character, the ability to synthesize biosurfactants is a desirable feature of potential candidates for bioaugmentation. Biosurfactants reduce both the surface and interfacial tension via emulsification and thus increase the availability of contaminants for microorganisms [86,87]. For example, the biodegradation efficiency of nonylphenol in wastewater significantly increased after bioaugmentation of the AS with biosurfactant-producing *Sphingomonas* sp. TTNP3 [31]. Similarly, Chen et al. [90] connected the increase in the removal of resin compounds from the effluent with the production of biosurfactants by *Gordonia* JW8 inoculated into the AS. In our study, *P. putida* OR45a, *P. putida* KB3, *P. putida* mt-2, *P. fluorescens*, and *S. maltophilia* KB2 were able to produce biosurfactants. However, the analysis of the potential biosurfactant producers based on their ability to emulsify hydrocarbons revealed that only *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 had a good emulsification activity (>45%).

It has been claimed that the ability of flagellated bacteria to move directly toward contaminants in wastewater plays an important role in the AS systems because it increases the bioavailability of the compounds for microorganisms. Moreover, this mechanism can support the competition of motile bacteria with the autochthonous microorganisms in the AS. Here, all of the tested bacteria exhibited swimming and swarming motility phenotypes. It was found that the presence of the KPL enhanced the chemotactic response of *R. erythropolis* KB4, *Planococcus* sp. S5, and *P. putida* N6, which resulted in a decrease in their swimming and swarming motility. The chemotaxis that was exhibited by *P. putida* OR45a, *P. putida* KB3, *S. maltophilia* KB2, *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp., and *G. soli* OR45b after the KPL had been added to the wastewater was primarily linked with the swimming motility and finally resulted in a decrease in the multicellular movement of the bacteria. Literature data indicated that this

phenomenon is common for many bacteria [91,92]. Interestingly, the KPL was found to increase the swarming motility of only *P. putida* mt-2.

Screening, which was based on phenotypes and biochemical tests, enabled the best two candidates *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 to be selected for the further bioaugmentation of the AS. They were characterized by the strongest metabolic capacity, the ability to support xenobiotic degradation and to incorporate into the AS. In order to get a deep insight into their genomes and identify the genes that belong to the metabolism of aromatic compounds, they were completely sequenced. An in silico genomic analysis revealed the presence of the genes encoding the oxygenase enzymes that are involved in the crucial steps in degrading aromatic compounds, i.e., hydroxylation and opening the aromatic ring (*hcA2* gene). It was found that *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 genomes harbored both the catechol 1,2-dioxygenase and catechol 2,3-dioxygenase genes (*catA* and *dmpB*), which are involved in degradation of catechol via the *ortho*- and *meta*-cleavage pathways, respectively. Moreover, the genomic data supported the results that had been obtained in the experimental tests, and thus confirmed the ability of *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 to biodegrade (methyl)phenols and benzoate efficiently. Because the degradation of aromatic compounds leads to the formation of reactive oxygen species such as H_2O_2 , OH^- and O_2^- , the presence of *oscA* gene, which encodes iron-dependent superoxide dismutase, can give these bacteria an advantage in surviving in unfavorable conditions. These results suggested that the bioaugmentation of the AS with *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 may be an auxiliary strategy to reduce the oxidative stress in the bioreactors exposed to various toxic compounds in effluents. Interestingly, both strains were able to biodegrade the toxic nitroalkane compounds due to the presence of gene cluster *npd* encoding 2-nitropropane dioxygenase, which belongs to the family of nitroalkane oxidizing enzymes and catalyze the oxidative denitrification of nitroalkanes to their corresponding carbonyl compounds and nitrites.

Literature data indicated that the embedment within an alginate matrix may be a suitable bioaugmentation approach to enhance the incorporation of inoculates into the AS flocs even in industrial-like wastewater treatment systems [93]. In this study, *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 were found to produce alginate. This exopolysaccharide is thought to have a protective function in a harsh environment in which microorganisms are continually subjected to oxidative stress [94]. Moreover, Lin et al. [95] reported that bacterial alginate greatly improved the formation and settleability of the aerobic granular bioparticles in the AS. In another study, Matz et al. [96] documented that the production of alginate by *P. aeruginosa* induced the formation of microcolonies that protected against protozoa.

Contamination of the leachate with phenolic compounds is often accompanied by heavy metals, organic solvents, antibiotics as well as ammonium ions. Therefore, the bacterial strains that will be used for bioaugmentation should be resistant to diverse toxic substances. The basic mechanisms of solvent tolerance in bacteria include the efflux pumps, which remove toxic solvents from bacterial cell membrane [97]. In both *Pseudomonas* candidates, a multidrug efflux pump of the resistance-nodulation-division family probably made a major contribution to the resistance to various solvents such as *n*-hexane, *p*-xylene, toluene, styrene, *m*-xylene, propylbenzene, and ethylbenzene. Moreover, *P. putida* KB3 was found to be resistant to antibiotics, including ampicillin, penicillin G, erythromycin, novobiocin, and tetracycline. From the application point of view, selected bacteria showed desirable traits to be used in the treatment of leachate-contaminated wastewater as they are simultaneously able to degrade aromatic hydrocarbons and thrive in the presence of pollutants that are known to limit the biodegradation of these compounds.

Here, *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 had a *mer* operon that confers a resistance to Hg^{2+} . However, the level of heavy-metal tolerance was higher in *P. putida* KB3 than in *P. putida* OR45a. The genome of *P. putida* KB3 harbored the *oscA* gene, which is involved in the sulfur starvation response in an ambient environment and is required to cope with the oxidative stress induced by chromium ions. Chromium is a heavy metal that is of commercial importance; thus, significant amounts of it are released into industrial wastewater. Unfortunately, this trace element was identified as an inhibitor of respiration and microbial growth in non-acclimated AS when was present at concentrations above

10 µg/mL [98]. In this study, the tolerance of *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 to 8.30 and 11.30 µg/µL of chromium was observed, respectively. Moreover, both of the *Pseudomonas* isolates exhibited a tolerance to a wide range of the heavy-metal ions (Cr, Ba, Cd, Pb, and Zn) that are commonly found in the KPL. Implementing the traditional AS technology for landfill leachate treatment is very challenging especially for mature and old leachates, which are characterized by high level of ammonia nitrogen (NH₃-N) of 360 to 2150 µg/mL [99]. It is well known that highly toxic NH₃-N significantly inhibits the growth and activity of the microorganisms in the AS systems and thus suppresses the biodegradation process [100]. Because of the aforementioned issues, it is necessary to remove ammonia nitrogen from wastewater. However, to date, there is scarce data about the successful bioaugmentation treatment of landfill leachate with high levels of NH₃-N [101]. In this study, the results of the tolerance tests indicated that *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 could survive in the KPL when the ammonia nitrogen concentration was as high as 600 and 1000 µg/mL, respectively.

To sum up, the extensive methodology used in this work allowed accurate characterization of the different capacities of many bacterial strains and select *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 as the best candidates for bioaugmentation of the AS in a conventional wastewater treatment plant struggling with the problem of continuous exposure and management of complex wastewater with unknown composition, such as those contaminated with landfill leachate. Due to the high capacity of selected strains to degrade phenolic compounds and ability to tolerate heavy metal stress, it can be expected that their presence in bioreactors may improve the biodegradation of pollutants in contaminated wastewater. Our pilot scale study conducted in the sequencing batch reactor (SBR) revealed that the bioaugmentation of the AS polluted with the KPL with selected *Pseudomonas* strains succeeded in achieving of over 80% of the COD removal efficiency, while the reduction of organic contaminants in the non-inoculated SBR was about 40%. This can be explained by the activity of oxidative enzymes in bacteria cells, which can alleviate the potential oxidative stress in biological systems induced by high concentrations of toxic pollutants. More importantly, the ability of *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 to communicate among themselves as well as with other microorganisms from the AS may determine their survival in WWTP. Alternatively, bacterial biomass can be immobilized on various carriers for enhancing survivability and degradative potential of the cells. Although the limitations of bioaugmentation still exist, this strategy seems to be a beneficial solution for improving many aspects of the treatment of industrial and leachate polluted wastewater.

5. Conclusions and Future Prospects

Bioaugmentation of the AS is considered to be a promising decontamination approach in the context of the various strategies that are applied to quickly remove contaminants from wastewater. However, selecting robust bacterial strains for bioaugmentation should depend on our knowledge not only about their catabolic potential, but also about their ability to survive in the AS. To date, few studies have made a comprehensive analysis of the factors that determine the specific characteristics of candidates for bioaugmentation and how they contribute to the operation and maintenance of wastewater treatment systems. The present study underscores the importance of using a multifaceted approach for selecting promising candidates to enhance the treatment of wastewater contaminated with the KPL. Moreover, it demonstrated that the genome-centric approach may be useful to complement the biochemical tests to select the best strains for specific bioaugmentation. Here, based on all of the conducted tests regarding their ability to degrade aromatics compounds, their survival in the presence of the KPL, their resistance to heavy metals, and their potentially positive influence on the AS structure and settleability, two bacterial strains, namely *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3, were selected as the best candidates for the bioremediation of KPL-contaminated wastewater. Currently, our research is focused on exploring whether using the selected *Pseudomonas* strains and their mixed co-culture can protect the structure and function of the AS microbial communities against the KPL and prevent operational problems in dedicated WWTP receiving the landfill leachate contaminated with aromatic compounds.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4441/12/1/140/s1>. Table S1: Composition of media used for characteristics of bioaugmentation candidates (section Materials and Methods), Table S2: General characteristics of genomes of *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3, Table S3: A distribution of the genes associated with the clusters of orthologous groups (COG) categories in the genomes of *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3, Table S4: Description of genes responsible for selected features of *P. putida* KB3 and *P. putida* OR45a.

Author Contributions: Conceptualization, J.M., A.M.; formal analysis, J.M., A.P., and J.Ż.; data curation, J.M. and A.P.; writing—original draft preparation, J.M. and A.M.; writing—review and editing, A.M.; visualization, J.M.; supervision, A.M.; project administration, J.M. and A.M.; funding acquisition, J.M. and A.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The paper was prepared in connection with the work done under the project granted on the basis of decision DEC-2016/23/N/NZ9/00158 and financed by the National Science Centre (Poland).

Acknowledgments: The research was performed due to the courtesy of the Chorzowski-Świętochłowickie Municipal Water and Sewage Company LLC and the Head of Wastewater Treatment Plant MSc Piotr Banaszek. The authors are also very grateful to Izabela Greń and Agnieszka Gąszczak for providing the bacterial strains, Michele L. Simmons for English correction, and Bożena Nowak for critical comments. We wish to thank Luis A. J. Mur (Aberystwyth University) for his assistance with the whole genome sequencing of *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 strains. The genome sequencing was provided by MicrobesNG (<http://www.microbesng.uk>), which is supported by the BBSRC (grant number BB/L024209/1).

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Schiopu, A.M.; Gavrilescu, M. Municipal solid waste landfilling and treatment of resulting liquid effluents. *Environ. Eng. Manag. J.* **2010**, *9*, 993–1019. [[CrossRef](#)]
2. Baderna, D.; Caloni, F.; Benfenati, E. Investigating landfill leachate toxicity in vitro: A review of cell models and endpoints. *Environ. Int.* **2019**, *122*, 21–30. [[CrossRef](#)]
3. Clifford, E.; Devroedt, C.; Morrison, L.; Healy, M.G. Treatment of landfill leachate in municipal wastewater treatment plants and impacts on effluent ammonium concentrations. *J. Environ. Manag.* **2017**, *188*, 64–72. [[CrossRef](#)]
4. Sonawane, J.M.; Adeloju, S.B.; Ghosh, P.C. Landfill leachate: A promising substrate for microbial fuel cells. *Int. J. Hydrog. Energy* **2017**, *42*, 23794–23798. [[CrossRef](#)]
5. Azzouz, L.; Boudiema, N.; Aouichat, F.; Kherat, M.; Mameri, N. Membrane bioreactor performance in treating Algiers' landfill leachate from using indigenous bacteria and inoculating with activated sludge. *Waste Manag.* **2018**, *75*, 384–390. [[CrossRef](#)]
6. Zheng, M.; Li, S.; Dong, Q.; Huang, X.; Liu, Y. Effect of blending landfill leachate with activated sludge on the domestic wastewater treatment process. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* **2019**, *5*, 268–276. [[CrossRef](#)]
7. Xie, B.; Xiong, S.; Liang, S.; Hu, C.; Zhang, X.; Lu, J. Performance and bacterial compositions of aged refuse reactors treating mature landfill leachate. *Bioresour. Technol.* **2012**, *103*, 71–77. [[CrossRef](#)]
8. Öman, B.C.; Junestedt, C. Chemical characterization of landfill leachates—400 parameters and compounds. *Waste Manag.* **2008**, *28*, 1876–1891. [[CrossRef](#)]
9. Naveen, B.P.; Mahapatra, D.M.; Sitharam, T.G.; Sivapullaiah, P.V.; Ramachandra, T.V. Physico-chemical and biological characterization of urban municipal landfill leachate. *Environ. Pollut.* **2017**, *220*, 1–12. [[CrossRef](#)]
10. Wang, K.; Lusheng, L.; Tan, F.; Wu, D. Treatment of landfill leachate using activated sludge technology: A review. *Archaea* **2018**, *2018*, 1–10. [[CrossRef](#)]
11. Capodici, M.; Di Trapani, D.; Viviani, G. Co-treatment of landfill leachate in laboratory-scale sequencing batch reactors: Analysis of system performance and biomass activity by means of respirometric techniques. *Water Sci. Technol.* **2014**, *69*, 1267–1274. [[CrossRef](#)]
12. Yuan, Q.; Jia, H.; Poveda, M. Study on the effect of landfill leachate on nutrient removal from municipal wastewater. *J. Environ. Sci.* **2016**, *43*, 150–158. [[CrossRef](#)]
13. Ren, Y.; Ferraz, F.; Kang, A.J.; Yuan, Q. Treatment of old landfill leachate with high ammonium content using aerobic granular sludge. *J. Biol. Eng.* **2017**, *11*, 42. [[CrossRef](#)]
14. Çeçen, F.; Tezel, U. *Hazardous Pollutants in Biological Treatment Systems: Fundamentals and A Guide to Experimental Research*; IWA Publishing: London, UK, 2018.

15. Tsiligeorgis, J.; Zouboulis, A.; Samaras, P.; Zamoulis, D. Application of a membrane sequencing batch reactor for landfill leachate treatment. *Desalination* **2008**, *221*, 483–493. [[CrossRef](#)]
16. Kalka, J. Landfill leachate toxicity removal in combined treatment with municipal wastewater. *Sci. World J.* **2012**, *2012*, 1–7. [[CrossRef](#)]
17. De Albuquerque, E.M.; Pozzi, E.; Sakamoto, I.K.; Jurandy, P. Treatability of landfill leachate combined with sanitary sewage in an activated sludge system. *J. Water Process Eng.* **2018**, *23*, 119–128. [[CrossRef](#)]
18. Bolyard, S.C.; Reinhart, D.R.; Lozinski, D.; Motlagh, A.M. Leachate Dissolved Organic Matter Impacts on Wastewater Effluent Quality. In Proceedings of the Global Waste Management Symposium, Palm Springs, CA, USA, 11–14 February 2018.
19. Michalska, J.; Greń, I.; Żur, J.; Wasilkowski, D.; Mroziak, A. Impact of the biological cotreatment of the Kalina pond leachate on laboratory sequencing batch reactor operation and activated sludge quality. *Water* **2019**, *11*, 1539. [[CrossRef](#)]
20. Ma, F.; Guo, J.; Zhao, L.; Chang, C.; Cui, D. Application of bioaugmentation to improve the activated sludge system into the contact oxidation system treating petrochemical wastewater. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 597–602. [[CrossRef](#)]
21. Semrany, S.; Faver, L.; Djelal, H.; Taha, S.; Amrane, A. Bioaugmentation: Possible solution in the treatment of bio-refractory organic compounds (Bio-ROCs). *Biochem. Eng. J.* **2012**, *69*, 75–86. [[CrossRef](#)]
22. Yang, Y.; Xie, L.; Tao, X.; Hu, K.; Huang, S. Municipal wastewater treatment by the bioaugmentation of *Bacillus* sp. K5 within a sequencing batch reactor. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0178837. [[CrossRef](#)]
23. Quan, X.; Shi, H.; Liu, H.; Wang, J.; Qian, Y. Removal of 2,4-dichlorophenol in a conventional activated sludge system through bioaugmentation. *Process Biochem.* **2004**, *11*, 1701–1707. [[CrossRef](#)]
24. Songzhe, F.U.; Hongxia, F.A.N.; Shuangjiang, L.I.U.; Ying, L.I.U.; Zhipei, L.I.U. A bioaugmentation failure caused by phage infection and a weak biofilm formation ability. *J. Environ. Sci.* **2009**, *21*, 1153–1161. [[CrossRef](#)]
25. Yu, F.B.; Ali, S.W.; Guan, L.B.; Li, S.P.; Zhou, S. Bioaugmentation of a sequencing batch reactor with *Pseudomonas putida* ONBA-17 and its impact on reactor bacterial communities. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *176*, 20–26. [[CrossRef](#)]
26. Fenu, A.; Donckels, B.M.R.; Beffa, T.; Bemfroh, C.; Weemaes, M. Evaluating the application of *Microbacterium* sp. strain BR1 for the removal of sulfamethoxazole in full-scale membrane bioreactors. *Water Sci. Technol.* **2015**, *72*, 1754–1761. [[CrossRef](#)]
27. Zhang, Q.Q.; Yang, G.F.; Zhang, L.; Zhang, Z.Z.; Tian, G.M.; Jin, R.C. Bioaugmentation as a useful strategy for performance enhancement in biological wastewater treatment undergoing different stresses: Application and mechanisms. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2017**, *47*, 1877–1899. [[CrossRef](#)]
28. Nguyen, P.Y.; Carvalho, G.; Reis, A.C.; Nunes, O.C.; Reis, M.A.M.; Oehmen, A. Impact of biogenic substrates on sulfamethoxazole biodegradation kinetics by *Achromobacter denitrificans* strain PR1. *Biodegradation* **2017**, *28*, 205–217. [[CrossRef](#)]
29. Yu, Z.; Mohn, W.W. Bioaugmentation with the resin acid-degrading bacterium *Zoogloea resiniphila* DhA-35 to counteract pH stress in an aerated lagoon treating pulp and paper mill effluent. *Water Res.* **2002**, *36*, 2793–2801. [[CrossRef](#)]
30. Monsalvo, V.M.; Tobajas, M.; Mohedano, A.F.; Rodriguez, J.J. Intensification of sequencing batch reactors by cometabolism and bioaugmentation with *Pseudomonas putida* for the biodegradation of 4-chlorophenol. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2012**, *87*, 1270–1275. [[CrossRef](#)]
31. Cirja, M.; Hommes, G.; Ivashechkin, P.; Prell, J.; Schäffer, A.; Corvini, F.X.; Lenz, M. Impact of bio-augmentation with *Sphingomonas* sp. strain TTNP3 in membrane bioreactors degrading nonylphenol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *84*, 183–189. [[CrossRef](#)]
32. Xenofontos, E.; Tanase, A.M.; Stoica, I.; Vyrides, I. Newly isolated alkaliphilic *Advenella* species bioaugmented in activated sludge for high *p*-cresol removal. *New Biotechnol.* **2016**, *33*, 305–310. [[CrossRef](#)]
33. Ji, J.; Kakade, A.; Zhang, R.; Zhao, S.; Khan, A.; Liu, P.; Li, X. Alcohol ethoxylate degradation of activated sludge is enhanced by bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. LZ-B. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, *169*, 335–343. [[CrossRef](#)]
34. Herrero, M.; Stuckey, D.C. Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: A review. *Chemosphere* **2015**, *140*, 119–128. [[CrossRef](#)]

35. Singer, A.C.; van der Gast, C.J.; Thompson, I.P. Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation. *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 74–77. [[CrossRef](#)]
36. Guzik, U.; Greń, I.; Wojcieszynska, D.; Łabużek, S. Isolation and characterization of a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilia* possessing various dioxygenases for monocyclic hydrocarbon degradation. *Braz. J. Microbiol.* **2009**, *40*, 285–291. [[CrossRef](#)]
37. Hupert-Kocurek, K.; Guzik, U.; Wojcieszynska, D. Characterization of catechol 2,3-dioxygenase from *Planococcus* sp. strain S5 induced by high phenol concentration. *Acta Biochim. Pol.* **2012**, *59*, 345–351. [[CrossRef](#)]
38. Gąszczak, A.; Bartelmus, G.; Greń, I.; Janecki, D. Kinetics of vinyl acetate biodegradation by *Pseudomonas fluorescens* PCM 2123. *Ecol. Chem. Eng.* **2018**, *25*, 487–502. [[CrossRef](#)]
39. Bae, H.S.; Lee, J.M.; Kim, Y.B.; Lee, S.T. Biodegradation of the mixtures of 4-chlorophenol and phenol by *Camomonas testosteroni* CPW301. *Biodegradation* **1996**, *7*, 463–469. [[CrossRef](#)]
40. ISO 5667-13:2011. *Water Quality—Sampling—Guidance on Sampling of Sludges*; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2011.
41. ISO 19458:2007P. *Water Quality—Sampling for Microbiological Analysis*; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2007.
42. Malik, A.; Sakamoto, M.; Hanazaki, S.; Osawa, M.; Suzuki, T.; Tochigi, M.; Kakii, K. Coaggregation among nonfloculating bacteria isolated from activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 6056–6063. [[CrossRef](#)]
43. Kurane, R.; Hatamochi, K.; Kakuno, T.; Kiyohara, M.; Hirano, M.; Taniguchi, Y. Production of a bioflocculant by *Rhodococcus erythropolis* S-1 grown on alcohols. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1994**, *58*, 428–429. [[CrossRef](#)]
44. Zhang, C.L.; Lin, B.; Xia, S.Q.; Wang, X.J.; Yang, A.M. Production and application of a novel bioflocculant by multiple-microorganism consortia using brewery wastewater as carbon source. *J. Environ. Sci.* **2007**, *19*, 667–673. [[CrossRef](#)]
45. Kos, B.; Susković, J.; Vuković, S.; Simpraga, M.; Frece, J.; Matosić, S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *94*, 981–987. [[CrossRef](#)]
46. Taghadosi, R.; Shakibbaie, M.R.; Masoumi, S. Biochemical detection of N-Acyl homoserine lactone from biofilm-forming uropathogenic *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection samples. *Rep. Biochem. Mol. Biol.* **2015**, *3*, 56–61.
47. Freeman, D.J.; Falkiner, F.R.; Keane, C.T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J. Clin. Pathol.* **1989**, *42*, 872–874. [[CrossRef](#)]
48. Déziel, E.; Comeau, Y.; Villemur, R. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 1195–1204. [[CrossRef](#)]
49. Pacwa-Płociniczak, M.; Płociniczak, T.; Iwan, J.; Źarska, M.; Chorażewski, M.; Dzida, M.; Piotrowska-Seget, Z. Isolation of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing bacteria and assessment their plant growth-promoting traits. *J. Environ. Manag.* **2016**, *168*, 175–184. [[CrossRef](#)]
50. Pacwa-Płociniczak, M.; Plaza, G.A.; Poliwooda, A.; Piotrowska-Seget, Z. Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2014**, *21*, 9385–9395. [[CrossRef](#)]
51. Lakshmanan, V.; Shantharaj, D.; Li, G.; Seyfferth, A.L.; Sherrier, J.D.; Bais, H.P. A natural rice rhizospheric bacterium abates arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* **2015**, *4*, 1037–1050. [[CrossRef](#)]
52. MicrobesNG. Available online: <https://microbesng.uk> (accessed on 1 October 2019).
53. Huerta-Cepas, J.; Szklarczyk, D.; Heller, D.; Hernández-Plaza, A.; Forslund, S.K.; Cook, H.; Mende, D.R.; Letunic, I.; Rattei, T.; Jensen, L.J.; et al. EggNOG 5.0: A hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acid Res.* **2019**, *47*, 309–314. [[CrossRef](#)]
54. BacMet—Antibacterial Biocide and Metal Resistance Genes Database. Available online: <http://bacmet.biomedicine.gu.se/index.html> (accessed on 1 October 2019).
55. Pal, C.; Bengtsson-Palme, J.; Kristiansson, E.; Larsson, D.G.J. BacMet: Antibacterial biocide and metal resistance genes database. *Nucleic Acid Res.* **2013**, *42*, 737–743. [[CrossRef](#)]

56. Pal, C.; Bengtsson-Palme, J.; Kristiansson, E.; Larsson, D.G.J. Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genom.* **2015**, *16*, 1–14. [[CrossRef](#)]
57. Krepesi, C.; Bánky, D.; Grolmusz, V. AmphoraNet: The webserver implementation of the AMPHORA2 metagenomic workflow suite. *Gene* **2014**, *533*, 538–540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Letunic, I.; Bork, P. Interactive tree of life (iTOL) v3: An online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 242–245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. iTOL: Interactive Tree of Life. Available online: <https://itol.embl.de/tree/15515823090118191539864834> (accessed on 1 October 2019).
60. Matilla, M.A.; Pizarro-Tobias, P.; Roca, A.; Fernández, M.; Duque, E.; Molina, L.; Wu, X.; van der Lelie, D.; Gómez, M.L.; Segura, A.; et al. Complete genome of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* BIRD-1. *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 1290. [[CrossRef](#)]
61. Dos Santos, V.A.; Heim, S.; Moore, E.R.; Strätz, M.; Timmis, K.N. Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **2004**, *6*, 1264–1286. [[CrossRef](#)]
62. Kurata, Y.; Ono, Y.; Ono, Y. Occurrence of phenols in leachates from municipal solid waste landfill sites in Japan. *J. Mater. Cycles Waste.* **2008**, *10*, 144–152. [[CrossRef](#)]
63. Kotowska, U.; Kapelewska, J.; Sturgulewska, J. Determination of phenols and pharmaceuticals in municipal wastewaters from Polish treatment plants by ultrasound-assisted emulsification-microextraction followed by GC-MS. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2013**, *21*, 1642–1652. [[CrossRef](#)]
64. Joshi, H.; Dave, R.; Venugopalan, V.P. Pumping iron to keep fit: Modulation of siderophore secretion helps efficient aromatic utilization in *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbiology* **2014**, *160*, 1393–1400. [[CrossRef](#)]
65. Li, C.; Zhu, L.; Pan, D.; Li, S.; Xiao, H.; Zhang, Z.; Shen, X.; Wang, Y.; Long, M. Siderophore-mediated iron acquisition enhances resistance to oxidative and aromatic compound stress in *Cupriavidus necator* JMP134. *Appl. Environ. Microbiol.* **2019**, *85*, e01938-18. [[CrossRef](#)]
66. Liu, X.; Chen, Y.; Zhang, X.; Wang, L. Aerobic granulation strategy for bioaugmentation of a sequencing batch reactor (SBR) treating high strength pyridine wastewater. *J. Hazard. Mater.* **2015**, *15*, 153–160. [[CrossRef](#)]
67. Cheng, Z.; Meng, X.; Wang, H.; Chen, M.; Li, M. Isolation and characterization of broad spectrum coaggregating bacteria from different water systems for potential use in bioaugmentation. *PLoS ONE* **2014**, *9*, 1–8. [[CrossRef](#)]
68. Jiang, H.L.; Tay, J.H.; Maszenian, A.M.; Tay, S.T.L. Enhanced phenol biodegradation and aerobic granulation by two coaggregating bacterial strains. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 6137–6142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Yao, Y.L.; Lv, Z.M.; Zhu, F.X.; Min, H.; Bian, C.M. Successful bioaugmentation of an activated sludge reactor with *Rhodococcus* sp. YYL for efficient tetrahydrofuran degradation. *J. Hazard. Mater.* **2013**, *261*, 550–558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Adav, S.S.; Lee, D.J.; Lai, J.Y. Intergeneric coaggregation of strains isolated from phenol-degrading aerobic granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *79*, 657–661. [[CrossRef](#)]
71. Di Gioia, D.; Fambrini, L.; Coppini, E.; Fava, F.; Barberio, C. Aggregation-based cooperation during bacterial aerobic degradation of polyethoxylated nonylphenols. *Res. Microbiol.* **2004**, *155*, 761–769. [[CrossRef](#)]
72. Song, Z.; Ning, T.; Chen, Y.; Cheng, X.; Ren, N. Bioaugmentation of aerobic granular sludge with the addition of a bioflocculant-producing consortium. *Adv. Mater. Res.* **2013**, *726*, 2530–2535. [[CrossRef](#)]
73. Guo, J.; Wang, J.; Cui, D.; Wang, L.; Ma, F.; Chang, C.C.; Yang, J. Application of bioaugmentation in the rapid start-up and stable operation of biological processes for municipal wastewater treatment at low temperatures. *Bioresour. Technol.* **2010**, *110*, 6622–6629. [[CrossRef](#)]
74. Nie, M.; Yin, X.; Jia, J.; Wang, Y.; Liu, S.; Shen, Q.; Li, P.; Wang, Z. Production of a novel bioflocculant MNXY1 by *Klebsiella pneumoniae* strain NY1 and application in precipitation of cyanobacteria and municipal wastewater treatment. *J. Appl. Microbiol.* **2011**, *111*, 547–558. [[CrossRef](#)]
75. Patil, S.V.; Patil, C.D.; Salunke, B.K.; Salunke, R.B. Studies on characterization of bioflocculant exopolysaccharide of *Azotobacter indicus* and its potential for wastewater treatment. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2011**, *163*, 463–472. [[CrossRef](#)]
76. Buthelezi, S.P.; Olaniran, A.O.; Pillay, B. Textile dye removal from wastewater effluents using bioflocculants produced by indigenous bacterial isolates. *Molecules* **2012**, *17*, 14260–14274. [[CrossRef](#)]

77. Tawila, Z.M.A.; Ismail, S.; Dadrasnia, A.; Usman, M.M. Production and characterization of a bioflocculant produced by *Bacillus salmalaya* 139SI-7 and its applications in wastewater treatment. *Molecules* **2018**, *23*, 2689. [[CrossRef](#)]
78. Zhang, F.; Jiang, W.; Wang, X.; Ji, X.; Wang, Y.; Zhang, W.; Chen, J. Culture condition effect on bioflocculant production and actual wastewater treatment application by different types of bioflocculants. In *Biodegradation and Bioremediation of Polluted Systems—New Advances and Technologies*; Chamy, R., Rosenkranz, F., Soler, L., Eds.; IntechOpen: London, UK, 2015. [[CrossRef](#)]
79. Gomaa, E.Z.; El-Meihy, R.M. Bacterial biosurfactant from *Citrobacter freundii* MG812314.1 as a bioremoval tool of heavy metals from wastewater. *Bull. Natl. Res. Cent.* **2019**, *43*, 69. [[CrossRef](#)]
80. Wang, J.; He, H.; Wang, M.; Wang, S.; Zhang, J.; Wei, W.; Xu, H.; Lv, Z.; Shen, D. Bioaugmentation of activated sludge with *Acinetobacter* sp. TW enhances nicotine degradation in a synthetic tobacco wastewater treatment system. *Bioresour. Technol.* **2013**, *142*, 445–453. [[CrossRef](#)]
81. Gnida, A.; Chorvatova, M.; Wanner, J. The role and significance of extracellular polymers in activated sludge. Part I: Literature review. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **2006**, *34*, 411–424. [[CrossRef](#)]
82. Hahn, M.W.; Moore, E.R.B.; Hofle, M.G. Role of microcolony formation in the protistan grazing defense of the aquatic bacterium *Pseudomonas* sp. MWH1. *Microb. Ecol.* **2000**, *39*, 175–185. [[CrossRef](#)]
83. Sheng, G.; Yu, H.; Li, X. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 882–894. [[CrossRef](#)]
84. More, T.T.; Yadav, J.S.S.; Yan, S.; Tyagi, R.D.; Surampalli, R.Y. Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. *J. Environ. Manag.* **2014**, *144*, 1–25. [[CrossRef](#)]
85. Gupta, A.; Thakur, I.S. Study of optimization of wastewater contaminant removal along with extracellular polymeric substances (EPS) production by a thermotolerant *Bacillus* sp. ISTVK1 isolated from heat shocked sewage sludge. *Bioresour. Technol.* **2016**, *213*, 21–30. [[CrossRef](#)]
86. Liu, X.W.; Sheng, G.P.; Yu, H.Q. Physicochemical characteristics of microbial granules. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 1061–1070. [[CrossRef](#)]
87. Fernandes, P.; Ferreira, B.S.; Cabral, J.M.S. Solvent tolerance in bacteria: Role of efflux pumps and cross-resistance with antibiotics. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2003**, *22*, 211–216. [[CrossRef](#)]
88. Wick, L.Y.; Pasche, N.; Bernasconi, S.M.; Pelz, O.; Harms, H. Characterization of multiple-substrate utilization by anthracene-degrading *Mycobacterium frederiksbergense* LB501T. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 6133–6142. [[CrossRef](#)]
89. de Carvalho, C.; da Cruz, A.; Pons, M.; Pinheiro, H.; Cabral, J.; da Fonseca, M.; Ferreira, B.S.; Fernandes, P. *Mycobacterium* sp., *Rhodococcus erythropolis*, and *Pseudomonas putida* behavior in the presence of organic solvents. *Microsc. Res. Tech.* **2004**, *64*, 215–222. [[CrossRef](#)]
90. Chen, J.; Zhan, P.; Koopman, B.; Fang, G.; Shi, Y. Bioaugmentation with *Gordonia* strain JW8 in treatment of pulp and paper wastewater. *Clean Technol. Environ.* **2012**, *14*, 899–904. [[CrossRef](#)]
91. Sampedro, I.; Parales, R.E.; Krell, T.; Hill, J.E. *Pseudomonas* chemotaxis. *FEMS Microbiol. Rev.* **2015**, *39*, 17–46. [[CrossRef](#)]
92. Karmakar, R.; Bhaskar, R.V.S.U.; Jesudasan, R.E.; Tirumkudulu, M.S.; Venkatesh, K.V. Enhancement of swimming speed leads to a more-efficient chemotactic response to repellent. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 1205–1214. [[CrossRef](#)]
93. Bouchez, T.; Patureau, D.; Delgenès, J.P.; Moletta, R. Successful bacterial incorporation into activated sludge flocs using alginate. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 1031–1032. [[CrossRef](#)]
94. Hentzer, M.; Teitzel, G.M.; Balzer, G.J.; Heydorn, A.; Molin, S.; Givskov, M.; Parsek, M.R. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 5395–5401. [[CrossRef](#)]
95. Lin, Y.; Wang, L.; Chi, Z.M.; Liu, X.Y. Bacterial alginate role in aerobic granular bio-particles formation and settleability improvement. *Sep. Sci. Technol.* **2008**, *43*, 1642–1652. [[CrossRef](#)]
96. Matz, C.; Bergfeld, T.; Rice, S.A.; Kjelleberg, S. Microcolonies, quorum sensing and cytotoxicity determine the survival of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to protozoan grazing. *Environ. Microbiol.* **2004**, *6*, 218–226. [[CrossRef](#)]
97. Rojas, A.; Duque, E.; Mosqueda, G.; Golden, G.; Hurtado, A.; Ramos, J.L.; Segura, A. Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 3967–3973. [[CrossRef](#)]

98. Stasinakis, A.S.; Mamais, D.; Thomaidis, N.S.; Lekkas, T.D. Effect of chromium (VI) on bacterial kinetics of heterotrophic biomass of activated sludge. *Water Res.* **2002**, *36*, 3341–3349. [[CrossRef](#)]
99. Kumar, D.; Alappat, B.J. Evaluating leachate contamination potential of landfill sites using leachate pollution index. *Clean Technol. Environ.* **2005**, *7*, 190–197. [[CrossRef](#)]
100. Li, X.Z.; Zhao, Q.L. Inhibition of microbial activity of activated sludge by ammonia in leachate. *Environ. Int.* **1999**, *25*, 961–968. [[CrossRef](#)]
101. Yu, D.; Yang, J.; Teng, F.; Feng, L.; Fang, X.; Ren, H. Bioaugmentation treatment of mature landfill leachate by new isolated ammonia nitrogen and humic acid resistant microorganism. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *24*, 987–997. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Table S1. Composition of media used for characteristics of bioaugmentation candidates (section Materials and Methods).

Medium	Composition	Concentration, g/L	Purpose
Mineral Salts Medium (MSM), pH=7.2	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3.78	Isolating the bacteria from the AS and soil
	KH ₂ PO ₄	0.5	
	NH ₄ Cl	5.0	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	
	yeast extract	0.01	
Phosphate buffered saline (PBS), pH=7.3	NaCl	0.8	Aggregation/coaggregation assays
	KCl	0.2	
	KH ₂ PO ₄	0.24	
	Na ₂ HPO ₄	1.44	
	KH ₂ PO ₄	0.7	
	Na ₂ HPO ₄	0.9	
	NaNO ₃	0.2	
Modified Mineral Salts Agar (MMSA)	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4	Screening the biosurfactant production
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1	
	agar	20.0	
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.0040	
	MnSO ₄ ·H ₂ O	0.0030	
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.0012	

Table S2. General characteristics of the genomes of *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3.

Characteristics	<i>P. putida</i> OR45a	<i>P. putida</i> KB3
Genome size	5 993 405 bp	5 772 482 bp
DNA G + C content	61.7%	61.3%
Mean coverage	39.69x	55.35x
Number of contigs	165	185
Genes number	5729	5581
tRNA number	72	73
Isolation source	AS	soil
GenBank accession	SPUU00000000.1	SPUT00000000.1

Table S3. A distribution of the genes associated with the clusters of orthologous groups (COG) categories in the genomes of *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3.

COG	Description	Genes of <i>P. putida</i> OR45a	%	Genes of <i>P. putida</i> KB3	%
A	RNA processing and modification	1	0.02	1	0.02
B	Chromatin structure and dynamics	3	0.05	2	0.04
C	Energy production and conversion	379	6.65	349	6.56
D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	50	0.88	47	0.88
E	Amino acid transport and metabolism	491	8.62	427	8.02
F	Nucleotide transport and metabolism	148	2.60	143	2.69
G	Carbohydrate transport and metabolism	258	4.53	206	3.87
H	Coenzyme transport and metabolism	204	3.58	193	3.63
I	Lipid transport and metabolism	180	3.16	151	2.84
J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	227	3.98	216	4.06
K	Transcription	524	9.20	461	8.66
L	Replication, recombination, and repair	200	3.51	237	4.45
M	Cell wall/membrane biogenesis	366	6.42	327	6.14
N	Cell motility	122	2.14	118	2.22
O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	138	2.42	147	2.76
P	Inorganic ion transport and metabolism	390	6.85	345	6.48
Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	166	2.91	127	2.39
S	Function unknown	1031	18.10	1004	18.86
T	Signal transduction mechanisms	315	5.53	289	5.43
U	Intracellular trafficking and secretion	105	1.84	120	2.25
V	Defense mechanisms	54	0.95	51	0.96
Genes not in COGs		345	6.06	362	6.80
Total number of genes		5697	100	5323	100

Table S4. Description of genes responsible for selected features of *P. putida* KB3 and *P. putida* OR45a.

Number	Gene	Protein description	<i>P. putida</i> KB3	<i>P. putida</i> OR45a
Exopolysaccharide production				
1	<i>algD</i>	GDP-mannose 6-dehydrogenase	TFW21123.1	TFW36676.1
2	<i>alg8</i>	Alginate biosynthesis protein Alg8	TFW21122.1	TFW36677.1
3	<i>alg44</i>	Mannuronan synthase	TFW21121.1	TFW36678.1
4	<i>algK</i>	Alginate biosynthesis protein AlgK	TFW21120.1	TFW36679.1
5	<i>algE</i>	Alginate production protein AlgE	TFW21119.1	TFW36680.1
6	<i>algG</i>	Mannuronan C5-epimerase	TFW21118.1	TFW36681.1
7	<i>algX</i>	Alginate biosynthesis protein AlgX	TFW21117.1	TFW36682.1
8	<i>algL</i>	Alginate lyase	TFW21116.1	TFW36683.1
9	<i>algI</i>	Probable alginate O-acetylase AlgI	-	TFW36684.1
10	<i>algJ</i>	Probable alginate O-acetylase AlgJ	TFW21115.1	TFW36685.1
11	<i>algF</i>	Alginate biosynthesis protein AlgF	TFW21114.1	TFW36686.1
12	<i>algA</i>	Alginate biosynthesis protein AlgA	TFW21113.1	TFW36687.1
13	<i>algU</i>	RNA polymerase sigma-H factor	TFW21112.1	TFW36688.1
Biocide and heavy metal resistance				
14	<i>cadR</i>	Transcriptional regulator CadR	TFW18997.1	TFW38200.1
15	<i>mepB</i>	Multidrug/solvent efflux pump membrane transporter MepB; the inner membrane transporter component of an organic solvent and antibiotic efflux pump; confers resistance to toluene, hexane, <i>p</i> -xylene, ampicillin, penicillin G, erythromycin, novobiocin and tetracycline	TFW23930.1	-
16	<i>mepC</i>	Multidrug/solvent efflux pump outer membrane protein MepC; the outer membrane component of an organic solvent and antibiotic efflux pump; confers resistance to toluene, hexane, <i>p</i> -xylene, ampicillin, penicillin G, erythromycin, novobiocin and tetracycline	TFW23931.1	-
17	<i>mexE</i>	Multidrug efflux RND membrane fusion protein MexE; part of mexE-mexF-oprN efflux operon, confers resistance to triclosan, <i>n</i> -hexane and <i>p</i> -xylene	TFW22484.1	TFW37358.1
18	<i>mexF</i>	Multidrug efflux RND transporter, permease protein MexF; part of mexE-mexF-oprN efflux operon, confers resistance to triclosan, <i>n</i> -hexane and <i>p</i> -xylene	TFW22485.1	TFW37357.1
19	<i>ruvB</i>	Oxidoreductase from malic enzyme family	TFW24205.1	TFW35747.1
20	<i>oscA</i>	Involved in the sulphur starvation response and in Cr(VI) resistance	TFW19225.1	TFW38233.1
21	<i>srpA</i>	Solvent-resistant efflux pump periplasmic linker SrpA; a component of an organic solvent efflux pump srpABC	TFW17525.1	TFW39932.1, TFW35140.1
22	<i>srpR</i>	Solvent efflux pump srpABC operon corepressor SrpR	TFW17523.1	TFW35142.1
23	<i>srpS</i>	Solvent efflux pump srpABC operon corepressor SrpS; In conjunction with SrpR represses the srpABC operon	-	TFW39933.1
24	<i>ttgA</i>	Toluene efflux pump periplasmic linker protein, involved in export of toluene, styrene, <i>m</i> -xylene, propylbenzene and ethylbenzene	TFW23929.1	TFW35252.1
25	<i>ttgB</i>	The inner membrane transporter component, involved in export of toluene, styrene, <i>m</i> -xylene, propylbenzene and ethylbenzene	-	TFW35253.1
26	<i>ttgC</i>	The outer membrane component, involved in export of toluene, styrene, <i>m</i> -xylene, propylbenzene and ethylbenzene	-	TFW35254.1
27	<i>ttgH</i>	The inner membrane transporter component, involved in export of toluene, styrene, <i>m</i> -xylene, propylbenzene and ethylbenzene	-	TFW39931.1, TFW35139.1
28	<i>ttgI</i>	The outer membrane component, involved in export of toluene, styrene, <i>m</i> -xylene, propylbenzene and ethylbenzene	TFW17357.1	TFW39930.1, TFW35138.1
29	<i>ttgR</i>	Toluene efflux pump ttgABC operon repressor ttgR	TFW23928.1	TFW35251.1
30	<i>ttgV</i>	HTH-type transcriptional regulator TtgV	TFW17524.1	TFW35141.1
31	<i>chrR</i>	A soluble quinone reductase that defends against H ₂ O ₂ , confers	TFW19616.1	TFW39953.1

resistance to potassium ferricyanide

32	<i>merA</i>	Mercury reductase enzyme	TFW17956.1	-
33	<i>merD</i>	HTH-type transcriptional regulator	TFW17957.1	-
34	<i>merE</i>	Mercuric resistance protein	TFW17958.1	-
35	<i>merP</i>	Part of the first pPB mer operon	TFW17955.1	-
36	<i>merR</i>	Mercuric resistance operon regulatory protein	TFW17953.1	-
37	<i>merT</i>	Part of the second pPB mer operon	TFW17954.1	-
38	<i>sodB</i>	Fe-dependent superoxide dismutase	TFW26874.1	TFW38846.1
Metabolism of aromatic compounds				
39	<i>pcaG</i>	Protocatechuate 3,4-dioxygenase, alpha	TFW21608.1	TFW36756.1
40	<i>pcaH</i>	Protocatechuate 3,4-dioxygenase, beta	TFW21607.1	TFW36757.1
41	<i>pcaB</i>	3-carboxy- <i>cis,cis</i> -muconate cycloisomerase	TFW23936.1	TFW35259.1
42	<i>pcaC</i>	4-carboxymuconolactone decarboxylase	TFW23934.1	TFW35257.1
43	<i>npd</i>	2-nitropropane dioxygenase	TFW26424.1	TFW38619.1
44	<i>catA</i>	Catechol 1,2-dioxygenase	TFW26313.1, TFW23377.1	TFW39591.1, TFW38715.1, TFW34356.1
45	<i>catB</i>	Muconate cycloisomerase	TFW26315.1	TFW38713.1, TFW34354.1
46	<i>catC</i>	Muconolactone D-isomerase	TFW26314.1	TFW38714.1, TFW34355.1
47	<i>pcaD</i>	3-oxoadipate enol-lactonase	TFW23935.1	TFW35258.1
48	<i>pcaI</i>	3-oxoadipate CoA-transferase, alpha	TFW26463.1	TFW40084.1
49	<i>pcaJ</i>	3-oxoadipate CoA-transferase, beta	TFW26464.1	TFW40083.1
50	<i>benR</i>	BenABC operon transcriptional activator BenR	TFW23383.1	TFW39585.1
51	<i>benA</i>	Benzoate 1,2-dioxygenase, alpha	TFW23382.1	TFW39586.1
52	<i>benB</i>	Benzoate 1,2-dioxygenase, beta	TFW23381.1	TFW39587.1
53	<i>benC</i>	Benzoate 1,2-dioxygenase electron transfer component	TFW23380.1	TFW39588.1
54	<i>benD</i>	1,6-dihydroxycyclohexa-2,4-diene-1-carboxylate dehydrogenase	TFW23379.1	TFW39589.1
55	<i>hcaA2</i>	Aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase	-	TFW39785.1, TFW34369.1
56	<i>dmpK</i>	Phenol hydroxylase P0 protein	TFW19854.1	TFW33964.1
57	<i>dmpL</i>	Phenol hydroxylase P1 protein	TFW19855.1	TFW33965.1
58	<i>dmpM</i>	Phenol hydroxylase P2 protein	TFW19856.1	TFW33966.1
59	<i>dmpN</i>	Phenol hydroxylase P3 protein	TFW19857.1	TFW33967.1
60	<i>dmpO</i>	Phenol hydroxylase P4 protein	TFW19858.1	TFW33968.1
61	<i>dmpP</i>	Phenol hydroxylase P5 protein	TFW19859.1	TFW33969.1
62	<i>dmpB</i>	Catechol 2,3-dioxygenase	TFW19861.1	TFW33971.1
63	<i>dmpC</i>	2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase	TFW19862.1	TFW33972.1
64	<i>dmpD</i>	2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase	TFW19863.1	TFW33973.1
65	<i>dmpE</i>	2-oxopent-4-dienoate hydratase	TFW19864.1	TFW33974.1
66	<i>dmpF</i>	Acetaldehyde dehydrogenase	TFW19865.1	TFW33975.1
67	<i>dmpG</i>	4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase	TFW19866.1	TFW33976.1
68	<i>dmpH</i>	4-oxalocrotonate decarboxylase	TFW19867.1	TFW33977.1
69	<i>dmpI</i>	2-hydroxymuconate tautomerase	TFW19868.1	TFW33978.1

II.5

Michalska J., Żur J., Piński A., Mroziak A. 2020b. Analysis of the bioaugmentation potential of *Pseudomonas putida* OR45a and *Pseudomonas putida* KB3 in the sequencing batch reactors fed with the phenolic landfill leachate. *Water*, 12(3): 1-21

Article

Analysis of the Bioaugmentation Potential of *Pseudomonas putida* OR45a and *Pseudomonas putida* KB3 in the Sequencing Batch Reactors Fed with the Phenolic Landfill Leachate

Justyna Michalska ^{*}, Artur Piński , Joanna Żur  and Agnieszka Mrozik 

Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection, Faculty of Natural Sciences, University of Silesia, Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, Poland; apinski@us.edu.pl (A.P.); joanna.zur@us.edu.pl (J.Z.); agnieszka.mrozik@us.edu.pl (A.M.)

^{*} Correspondence: jmichalska@us.edu.pl

Received: 27 February 2020; Accepted: 20 March 2020; Published: 23 March 2020



Abstract: The treatment of landfill leachate could be challenging for the biological wastewater treatment systems due to its high toxicity and the presence of poorly biodegradable contaminants. In this study, the bioaugmentation technology was successfully applied in sequencing batch reactors (SBRs) fed with the phenolic landfill leachate by inoculation of the activated sludge (AS) with two phenol-degrading *Pseudomonas putida* OR45a and *Pseudomonas putida* KB3 strains. According to the results, the SBRs bioaugmented with *Pseudomonas* strains withstood the increasing concentrations of the leachate. This resulted in the higher removal efficiency of the chemical oxygen demand (COD) of 79–86%, ammonia nitrogen of 87–88% and phenolic compounds of 85–96% as compared to 45%, 64%, and 50% for the noninoculated SBR. Simultaneously, the bioaugmentation of the AS allowed to maintain the high enzymatic activity of dehydrogenases, nonspecific esterases, and catalase in this ecosystem, which contributed to the higher functional capacity of indigenous microorganisms than in the noninoculated AS. Herein, the stress level experienced by the microorganisms in the SBRs fed with the leachate computed based on the cellular ATP measurements showed that the abundance of exogenous *Pseudomonas* strains in the bioreactors contributed to the reduction in effluent toxicity, which was reflected by a decrease in the stress biomass index to 32–45% as compared to the nonbioaugmented AS (76%).

Keywords: activated sludge; bioaugmentation potential; landfill leachate; phenolic compounds; *Pseudomonas*; wastewater quality

1. Introduction

The global upsurge in the urbanization and industrialization is inextricably associated with an increase in municipal and industrial solid waste generation. Although, the European Union Waste Framework Directive (2008/98/EC) has made strict requirements for waste management, landfilling or open dumping still constitute the most prominent practices of waste disposal [1]. The inevitable obstacle arising from waste management is the formation of heavily polluted leachate emerging from the percolation of rainwater through the layers of landfill or dump [2]. Numerous studies have confirmed that the landfill leachate is a reservoir of elevated concentrations of contaminants of emerging concern (CECs), such as phenolic compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons, pharmaceuticals, heavy metals, chloride, cyanides, sulfur compounds, humic acids, and ammonia nitrogen, which should be eliminated for the mitigation of leachate toxicity before its discharge into the environment. The landfill leachate composition often varies temporally and spatially, which makes it extremely

difficult to treat [3–7]. So far, a wide range of physical and chemical technologies have been explored for the leachate purification, including coagulation/flocculation, ozonation, membrane filtration, activated carbon adsorption, chemical precipitation, oxidation and ion exchange processes. However, their application in a real scale was reported to be economically unfeasible due to the high operational costs as well as problems concerning the management of chemical sludge and toxic secondary metabolites generated during the treatment process [8–10]. Sewage plants in Poland frequently exploit the biological AS technology for the treatment of the landfill leachate in wastewater stream due to the ease of operation, low financial investment, and environmental friendliness. However, many toxic constituents of the landfill leachate are only partially transformed or not susceptible to degradation in this ecosystem and may hamper the AS process [11,12]. Therefore, the introduction of new metabolic functions into the AS ecosystem by the addition of precisely selected exogenous microorganisms, referred to as bioaugmentation, might provide a solution for the improvement of degradation of recalcitrant and toxic compounds present in the landfill leachate. So far, the bioaugmentation technique has been proved to improve not only the degradation efficiency but also to enhance the bioreactor performance, through the protection of autochthonous microbial communities against adverse effects and compensation for organic or hydraulic overloading [13]. However, the application of this strategy for the treatment of wastewater is not frequently practiced in sewage plants, because the fate of inoculated bacteria is unpredictable and difficult to monitor in the harsh AS conditions [14,15]. Nevertheless, it is assumed that the inoculation of sludge with a group of functionally similar bacterial strains has an advantage over the introduction of a single strain into the bioreactor and may improve the reliability of bioaugmentation, because the mixed microbial consortia are capable of utilizing multiple compounds, due to the mutual complementation of their degradative capacities [16–18].

The successful implementation of bioaugmentation in the AS depends on the efficiency of inoculated bacteria to degrade pollutants under natural conditions and their ability to adapt to the sludge environment and compete with autochthonous bacteria [19]. *Pseudomonas* strains are frequently reported as exhibiting a great metabolic versatility [20,21]. Thus, bacteria belonging to this genus can survive in different ecological niches including environments contaminated with aromatic compounds and they may be considered as potential candidates for the bioaugmentation strategy [22–26]. Unfortunately, information about their use in the bioaugmentation of the biological reactors for the treatment of the industrial and landfill leachates are scarce.

The AS process is usually controlled by the standard operational parameters including the total suspended solids, pH, chemical, and biochemical oxygen demand as well as total phosphorus and nitrogen. However, these parameters show only a slow change over time, which makes it difficult to predict the response of the AS system to any disturbances caused by the leachate and thus preventing the operational problems in the wastewater treatment plant [27]. Therefore, a combination of standard operational parameters with more reliable and accurate methods such as the specific oxygen uptake rate (SOUR), measurement of the ATP concentration, activities of key enzymes involved in the wastewater treatment and microbial community-level physiological profiling can help to determine the specific changes in the AS microbial communities to compare multiple conditions during the biological treatment of the landfill leachate [12].

Herein, the exploitation of bioaugmentation potential of two newly isolated *Pseudomonas putida* OR45a and *Pseudomonas putida* KB3 strains, which harbor the key degradation pathways and have abilities to survive and incorporate into the AS system, was proposed as a desirable approach for the removal of contaminants in wastewater spiked with the phenolic landfill leachate. Given this, individual *Pseudomonas putida* strains and their mixed consortium were inoculated into the SBRs operated in the conditions of long-term exposure to the increasing concentrations of the phenolic landfill leachate. To analyze the effectiveness of bioaugmentation strategy, the specific goals of this research were: (1) evaluating the removal efficiency of the COD, N-NH₃ and phenolic compounds in the SBRs, (2) assessing the quality of effluents generated during the leachate wastewater treatment, (3) determining the AS condition, (4) analyzing the functional capacity of indigenous microorganisms,

and (5) establishing the relationships between the factors being studied and evaluating the efficiency of bioaugmentation strategy.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Collection

The landfill leachate was taken from the bottom sediments of the Kalina Pond in Świętochłowice (Upper Silesia, Poland), which serves as the site for uncontrolled and arbitrary disposal of both municipal and industrial waste [12]. The sediment samples were collected in June 2018 at the point of discharge of effluents from the industrial waste dump to the reservoir at a distance of 2 m from the shore and at a depth of 2 m, following the EN ISO 5667-13:2011 [28] and EN ISO 19458:2007P [29].

The AS inoculum was sampled directly from the aeration tank of the wastewater treatment plant Klimzowiec (Chorzów, Poland) and acclimatized to the synthetic wastewater for three weeks before the start of actual bioaugmentation experiment [30].

2.2. Bacterial Strains

Two bacterial strains used in this study, *Pseudomonas putida* OR45a (GenBank SPUU00000000.1) and *Pseudomonas putida* KB3 (GenBank SPUT00000000.1), have previously been described as able to degrade high concentrations of phenol and its derivatives [26]. Before the inoculation of the AS, pure colonies of bacterial strains were cultivated separately in the mineral salts medium [26] containing 300 mg/L of phenol (Merck, Darmstadt, Germany) as the sole carbon and energy source at 23 ± 2 °C with agitation at 130 rpm for 72 h under the proviso that every 24 h a new dose of phenol was applied. Subsequently, the cells were harvested by centrifugation at 4 °C for 15 min at $5.000 \times g$ and rinsed three times with sterile mineral salts medium before they were used in the bioaugmentation experiment.

2.3. Composition of the Phenolic Landfill Leachate

The concentration of phenolic compounds in the landfill leachate was artificially increased from almost 200 mg/L [12] to 1700 mg/L, to mimic its real composition that was reported in wastewater discharged into the sewage plant Klimzowiec after the revitalization process of the Kalina pond in 2014. For this purpose, the leachate was spiked with a mixture of seven phenolic compounds (Table 1), which occurrence has been previously described in the reservoir [31]. Phenol and its derivatives were acquired from Merck (Darmstadt, Germany).

Table 1. Composition of the artificial mixture of phenols in the phenolic landfill leachate.

Phenolic Compound	Concentration (mg/L)
phenol	327
3-methylphenol	356
4-methylphenol	356
3-ethylphenol	129
2,4-dimethylphenol	60
3,4-dimethylphenol	281
2,3,5-trimethylphenol	292

2.4. The Experimental Set-Up and Batch Bioaugmentation Experiment

The study was conducted in the experimental model of the SBRs which performs all the functions of the conventional activated sludge plant. The experimental set-up (Figure 1) consisted of eight SBRs: four control bioreactors (C), which were fed only with the synthetic wastewater composed as described in [12] and four bioreactors, which were fed with the synthetic wastewater and three concentrations of the phenolic landfill leachate (L)—3.5% of the influent for the first 32 days of the experiment (I stage), 5.5% of the influent for the next 32 days (II stage) and 12.5% of the influent for another 32 days (III

stage). Two concentrations of the leachate (3.5% and 5.5%) were chosen based on its content reported in the influent discharged into the sewage plant Klimzowiec. In turn, 12.5% of the leachate corresponded with the concentration, which caused almost complete inhibition of the microbial growth in the AS in the acute toxicity testing [12].

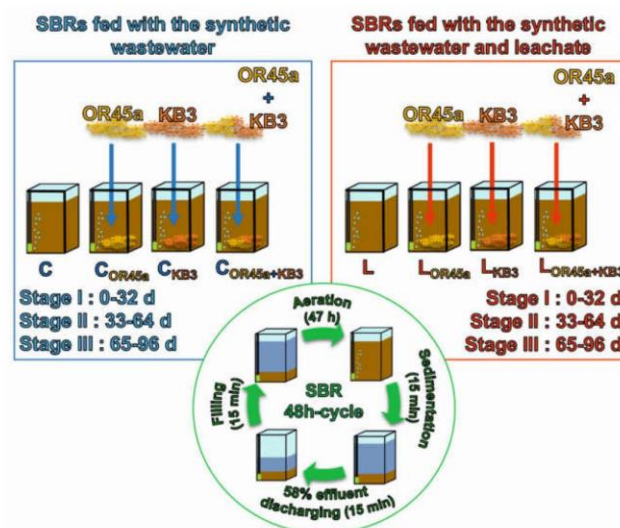


Figure 1. Scheme of the experimental set-up.

The AS was inoculated into the bioreactors and mixed with wastewater to obtain a biomass concentration of 3 g/L. Two SBRs: C and L were noninoculated, whereas the bioaugmentation experiment was performed in the bioreactors C_{OR45a} and L_{OR45a} inoculated with *P. putida* OR45a, bioreactors C_{KB3} and L_{KB3} bioaugmented with the *P. putida* KB3, as well as in the bioreactors $C_{OR45a+KB3}$ and $L_{OR45a+KB3}$ inoculated with an equal concentration of biomass of both microorganisms (1:1). The initial amounts of biomass of *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 in the SBRs corresponded to 0.5% of the initial AS biomass (approximately 10^6 CFU/g of mixed liquor suspended solids, MLSS). To avoid inoculated bacteria being washed out from the AS system, the bioaugmentation procedure was reiterated after the first two times of the removal of effluent.

The dissolved oxygen (DO) level in all SBRs was maintained at a range not exceeding 4 g/L and was monitored using an Elmetron COG-1 oxygen electrode (Elmetron®, Zabrze, Poland) [32]. The pH in the SBRs was not corrected during the experiment. The experiment was conducted within 96 days. After every 32 days and before the addition of a higher concentration of the leachate into the bioreactors, the concentration of the AS biomass in all SBRs was once again brought to 3 g/L by discharging the excess sludge. The bioreactors with a working volume of 9-L operated sequentially at 23 ± 2 °C within a 48-h cycle (Figure 1) [12]. Every second day, 50% of effluent was removed and replaced by the same volume of the synthetic wastewater, with or without the addition of constant portions of the leachate to reflect the operating cycle of the sewage plant Klimzowiec.

2.5. Determining the Concentration of Selected Phenolic Compounds in Wastewater

To measure the total concentration of phenol, 3-methylphenol, 4-methylphenol, 2,4-dimethylphenol, 3,4-dimethylphenol, and 2,3,5-trimethylphenol in the SBRs, effluents were sampled after the initial feeding of bioreactors and then every 32 days of their operation. The effluents were centrifuged twice at 4 °C for 15 min at $21,913 \times g$. The concentrations of phenolic compounds were determined using the method with 4-aminoantipyrine according to [33]. Because this method does not allow one to measure the concentration of *para*-substituted phenols, the content of phenolic compounds was additionally analyzed chromatographically using a Merck Hitachi HPLC equipped with an Ascentis® Express

C18 HPLC Column (100 × 4.6 mm), an Opti-Solv[®] EXP precolumn and a DAD detector derived from Merck Hitachi (Darmstadt, Germany). The mobile phase consisted of a mixture of methanol and 1% acetic acid in a ratio of 50:50 (*v/v*) at 1 mL/min flow. The phenolic compounds in the supernatant were identified and quantified by comparing their HPLC retention times and UV-visible spectra with those of the external standards.

2.6. Determining the Selected Physicochemical Parameters of the AS and Wastewater Quality

Selected parameters including pH, COD, MLSS, and sludge volume index were measured every 32 days of the SBRs operation as in the reference [32]. The N-NH₃ concentration was measured using Nessler's reagent colorimetric method. The turbidity of treated effluent was measured spectrophotometrically at a wavelength of 750 nm using the filtered effluent as a blank to avoid the interference of color generated from the samples [34]. The quality of effluent was expressed as the wastewater quality index calculated using the weighted arithmetic method proposed by [35], which was based on the following parameters of effluent: pH, dissolved oxygen, COD, concentration of phenolic compounds, and N-NH₃.

2.7. Enumeration of Total Heterotrophic Bacteria in the AS

The heterotrophic microorganisms were extracted from the AS, as described in [12] and enumerated according to [36]. The number of microorganisms able to use phenol as a sole carbon and energy source was calculated by the plate method with mineral salts agar medium supplemented with 300 mg/L of phenol and expressed as the CFU/g of the MLSS.

2.8. Measuring the Enzymatic Activity of the AS

Dehydrogenase activity in the AS was determined following the method of [37]. The activity of nonspecific esterase was measured according to [38], whereas the catalase activity was assayed by the method of back-titrating unreacted H₂O₂ with KMnO₄ [39].

2.9. Determining the Specific Oxygen Uptake Rate in the Bioreactors

The specific oxygen uptake rate (SOUR) in the SBRs was measured according to [40] with minor modifications. 100 mL of the AS were withdrawn from the bioreactor and introduced to the Winkler bottle placed on a magnetic stir plate. The AS was monitored for the DO depletion using the COG-1 oxygen sensor connected to the DO-meter (Elmetron, Zabrze, Poland). The DO was measured at 30 s intervals until it was completely exhausted. The SOUR in the SBRs were computed according to the following Equation (1):

$$\text{SOUR} \left(\frac{\text{mgO}_2}{\text{g MLSS} \times \text{h}} \right) = \frac{d[\text{DO}]}{dt} \times \frac{1}{\text{MLSS}} \quad (1)$$

where: DO—dissolved oxygen, $\frac{d[\text{DO}]}{dt}$ —value of the slope of the DO concentration against time plot, MLSS—mixed liquor solids suspended in the AS.

2.10. Determining the ATP Concentration in the AS

Total and dissolved ATP were measured using the BacTiter-Glo[™] Microbial Cell Viability Assay (Promega Corporation, Dübendorf, Switzerland). The cellular ATP was calculated as the subtraction between total and dissolved ATP. Before the measurement of the total ATP, sludge flocs were disaggregated according to [12], which permitted the recovery of bacterial cells from the flocs without affecting the microbial viability. The dissolved ATP was determined in previously filtered samples of the AS with the exclusion of the extraction stage. Both forms of the ATP were extracted from the sludge samples as described in [41]. Subsequently, concentrations of the total ATP and dissolved ATP were determined using the BacTiter-Glo[™] reagent prepared according to the manufacturer's guidelines. For this purpose, 25 µL of the BacTiter-Glo[™] reagent was mixed with the 250 µL of the

sample in the well of Microlite™ Luminescence Microtiter® 96-well plate (Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts, USA) and incubated at 37 °C for 20 s. The calibration curve was prepared from a concentration of 10 pM to 1 μM using the ATP solution obtained from dissolving Na₂ATP·3H₂O in sterilized deionized water (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA).

Based on the concentration of all forms of the ATP in the AS samples, the active biomass and biomass stress indices were calculated according to [42] using the Equations (2) and (3):

$$\text{Active biomass index (\%)} = \frac{\text{dissolved ATP}}{\text{total ATP}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{Biomass stress index (\%)} = \frac{\text{cellular ATP} \cdot 0.5}{\text{MLSS}} \times 100\% \quad (3)$$

where: MLSS—mixed liquor suspended solids in the bioreactors, 0.5—a conversion factor from the ATP concentration to dry biomass concentration.

2.11. Assessing the Functional Capacity of Microorganisms in the AS

The community-level physiological profiles using Biolog® 96-well EcoPlates™ (BIOLOG Inc., Hayward, CA, USA) were used to assess the functional capacity of microbial communities in the AS. These analyses were performed at the beginning, after 32 and 64 days of the bioaugmentation experiment. For this purpose, the AS samples collected from the SBRs were prepared according to [12].

The functional capacity indices—Shannon–Weaver diversity index (H'_{ECO}), metabolic richness index (S), Gini coefficient (G), average well color development (AWCD) and kinetic parameters of the curve—time at which the total microbial activity increased at the fastest rate (Av_{t50}) and maximum microbial activity (A_{max}) were estimated by fitting empirical data obtained for each substrate to the Verhulst logistic equation using the Levenberg–Marquardt algorithm implemented in the leastsq function of Python's SciPy package [12] and analyzed using free R-Studio software.

For a more detailed analysis, substrates in the Biolog® EcoPlate™ were divided into seven classes of compounds. In addition, the utilization of carbon sources was expressed as the carbon use index. Concerning overall substrate utilization, the usage of phosphorus and nitrogen-containing compounds was also calculated [43].

2.12. Statistical Analysis

All of the data were expressed as the mean and standard deviation and calculated using Microsoft Office Excel 2010. The factors that might influence the changes between the noninoculated and bioaugmented bioreactors during the wastewater treatment were assessed in Statistica® 12.5 PL (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA) using the principal component analysis (PCA) based on a Spearman correlation matrix. The components, which explain the maximum amount of variance in original variables were applied to explore the underlying similarity structures between the SBRs using the cluster analysis. Before clustering, all of the data were first subjected to min–max normalization according to the following Equation (4):

$$ND = \frac{RD_i - RD_{max}}{RD_{max} - RD_{min}} \quad (4)$$

where, ND (normalized data)—all of the variables scaled to the range (0, 1); RD_i —the initial raw data; RD_{min} —the minimal value of each parameter in a data set; RD_{max} —the maximal value of each parameter in a data set.

The changes between the noninoculated and bioaugmented SBRs during treatment with only the synthetic wastewater or cotreatment with the phenolic landfill leachate were determined using a one-way analysis of variance (ANOVA, post hoc test) and performed in Statistica® 12.5 PL (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA). The analyses allowed to separate the treatments from controls, as

well as among themselves, by applying the post hoc LSD at confidence intervals of 95% ($p < 0.05$). The values that are indicated by different lower case letters were statistically significant.

Bonferroni’s test for multiple comparisons was used to study the dissimilarities between the control SBRs and those fed with the leachate and was performed in GraphPad Prism5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) The differences are indicated by asterisks (Bonferroni correction, $p = ns \geq 0.05 \geq * > 0.01 \geq ** > 0.001 \geq *** > 0.001 \geq ****$) where ns, *, **, ***, and **** indicate no significant differences, significant differences, very significant differences, and extremely significant differences, respectively.

3. Results

3.1. The impact of Wastewater Composition and Bioaugmentation on the Operational Parameters of the Bioreactors and Effluent Quality

As shown in Figure 2C,D the increase in the leachate concentration in wastewater was correlated with the gradual decrease in both, the COD and N-NH₃ removal efficiency in the bioreactor L. After 96 days of the cotreatment of wastewater with the leachate, the COD and N-NH₃ removal efficiency decreased from 95% and 87% to 45% and 64%, respectively. By contrast, bioaugmentation of the SBRs fed with the leachate (L_{OR45a}, L_{KB3}, and L_{OR45a+KB3}) allowed to maintain significantly higher COD and N-NH₃ removal efficiency within a range of 79–86% and 87–88%, respectively (Figure 2A,B, Table S1). Interestingly, the appearance of *P. putida* KB3 contributed to the improvement of N-NH₃ removal in the control SBRs (C_{KB3} and C_{OR45a+KB3}).

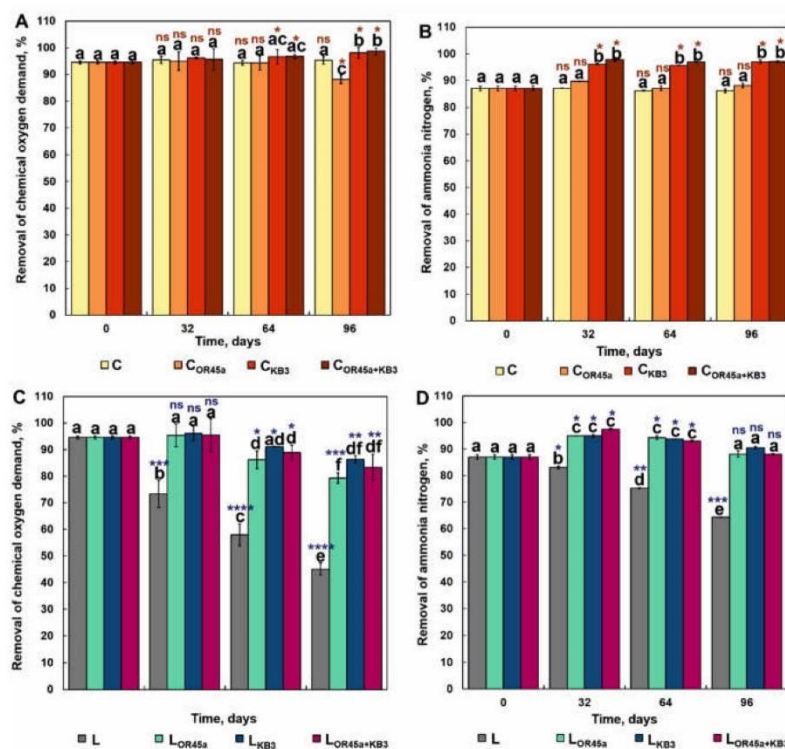


Figure 2. Changes in the removal efficiency of chemical oxygen demand and ammonia nitrogen in the noninoculated and bioaugmented activated sludge (AS), fed only with the synthetic wastewater (A,B) and cotreated with the phenolic landfill leachate (C,D). The treatments are separated among themselves in each stage. The values that are indicated by different lower case letters are statistically significant. The changes in the SBRs during the wastewater treatment are indicated by asterisks.

The removal of contaminants in the bioreactor L was accompanied by the gradual increase in the pH value from 7.22 to 9.47 during 96 days of wastewater treatment (Table S1). The pH in the bioaugmented control SBRs (C_{OR45a} , C_{KB3} and $C_{OR45a+KB3}$) showed a generally higher value during the I stage (0–32 day) and III stage (64–96 day) of the experiment. In turn, bioaugmentation of the AS resulted in the production of less alkaline wastewater with the pH value of 7.45, 8.19 and 7.48 in the SBRs cotreated with the leachate (L_{OR45a} , L_{KB3} and $L_{OR45a+KB3}$), respectively.

Herein, the efficiency of removal of phenolic compounds in wastewater was higher in the bioaugmented SBRs (Table 2). Microorganisms in the bioreactor L were not able to completely degrade phenolic compounds present in the leachate. Moreover, the increase in the leachate concentration from 3.5% to 5.5% and then to 12.5% resulted in a gradual reduction in removal efficiency of phenolic compounds from 71–76% to 55–58% and then to 45–50%, respectively. The results indicated that enrichment of autochthonous microorganisms with *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 contributed to the complete utilization of phenolic compounds present in wastewater continuously spiked with 3.5% of the leachate within 32 days. In addition, bioaugmentation of the bioreactor with *P. putida* KB3 (L_{KB3}) succeeded in the complete removal of phenolic compounds even after the increase of the leachate concentration to 5.5%. However, when the concentration of the leachate was brought to 12.5%, the removal efficiency of phenolic compounds decreased in the bioaugmented SBRs (L_{OR45a} , L_{KB3} , and $L_{OR45a+KB3}$) by 5–15%.

Table 2. Changes in the concentration of phenolic compounds in the noninoculated and bioaugmented sequencing batch reactors (SBRs) fed with the phenolic landfill leachate during 96 days.

Bioreactor	L	L_{OR45a}	L_{KB3}	$L_{OR45a+KB3}$
Time (days/stage)	Concentration of Phenolic Compounds Determined with 4-Aminoantypyrine (mg/L)			
0 (onset of the stage I)	71.01 ± 3.06 ^a	72.04 ± 1.95 ^a	72.64 ± 2.18 ^a	76.12 ± 4.23 ^a
32 (end of the stage I)	17.17 ± 2.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b
32 (onset of the stage II)	126.32 ± 9.05 ^a	105.55 ± 0.10 ^b	108.13 ± 1.65 ^b	111.11 ± 3.18 ^b
64 (end of the stage II)	53.13 ± 4.65 ^a	10.77 ± 0.50 ^b	0.00 ± 0.00 ^c	3.97 ± 6.02 ^d
64 (onset of the stage III)	316.19 ± 10.03 ^a	244.00 ± 3.82 ^b	233.01 ± 0.12 ^c	245.50 ± 2.27 ^b
96 (end of the stage III)	173.80 ± 8.95 ^a	37.24 ± 5.07 ^b	10.13 ± 1.03 ^c	29.04 ± 1.16 ^b
Bioreactor	L	L_{OR45a}	L_{KB3}	$L_{OR45a+KB3}$
Time (days/stage)	Concentration of Phenolic Compounds Determined by the HPLC (mg/L)			
0 (onset of the stage I)	52.11 ± 6.64 ^a	55.06 ± 3.82 ^a	49.86 ± 1.37 ^a	52.44 ± 2.28 ^a
32 (end of the stage I)	14.94 ± 0.53 ^a	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b
32 (onset of the stage II)	89.22 ± 4.55 ^a	75.00 ± 0.78 ^b	79.60 ± 0.34 ^b	74.84 ± 2.34 ^b
64 (end of the stage II)	39.78 ± 2.22 ^a	9.66 ± 0.79 ^b	0.00 ± 0.00 ^c	5.13 ± 0.21 ^d
64 (onset of the stage III)	218 ± 5.13 ^a	189.50 ± 3.60 ^b	184.97 ± 2.99 ^b	202.00 ± 8.02 ^c
96 (end of the stage III)	108.68 ± 9.02 ^a	19.15 ± 0.39 ^b	9.55 ± 0.12 ^c	19.74 ± 7.00 ^b

The treatments are separated among themselves in each stage. The values that are indicated by different lower case letters are statistically significant.

Knowledge about the AS condition is important for the accurate prediction of the quality of effluent. Herein, the sludge volume index and wastewater turbidity were evaluated to assess the effectiveness of the wastewater treatment process in the SBRs. It was found that the settleability of the AS was negatively affected by the addition of the leachate, which caused a gradual reduction in sludge volume index from 125 cm³/g to 48 cm³/g during the wastewater treatment process in the bioreactor L (Figure 3C). At the same time, the AS in the bioreactor C showed better settleability amounted 103 cm³/g (Figure 3A). Similarly, the inoculated control SBRs underwent some fluctuations in the sludge settleability, achieving the sludge volume index of 142 cm³/g, 108 cm³/g, and 121 cm³/g at the end of the III stage of the wastewater treatment process. Nevertheless, the introduction of *Pseudomonas* strains into the SBRs fed with the leachate led to the improvement of its settleability with the increase in the pollutant concentration from 3.5% to 5.5% (Figure 3C).

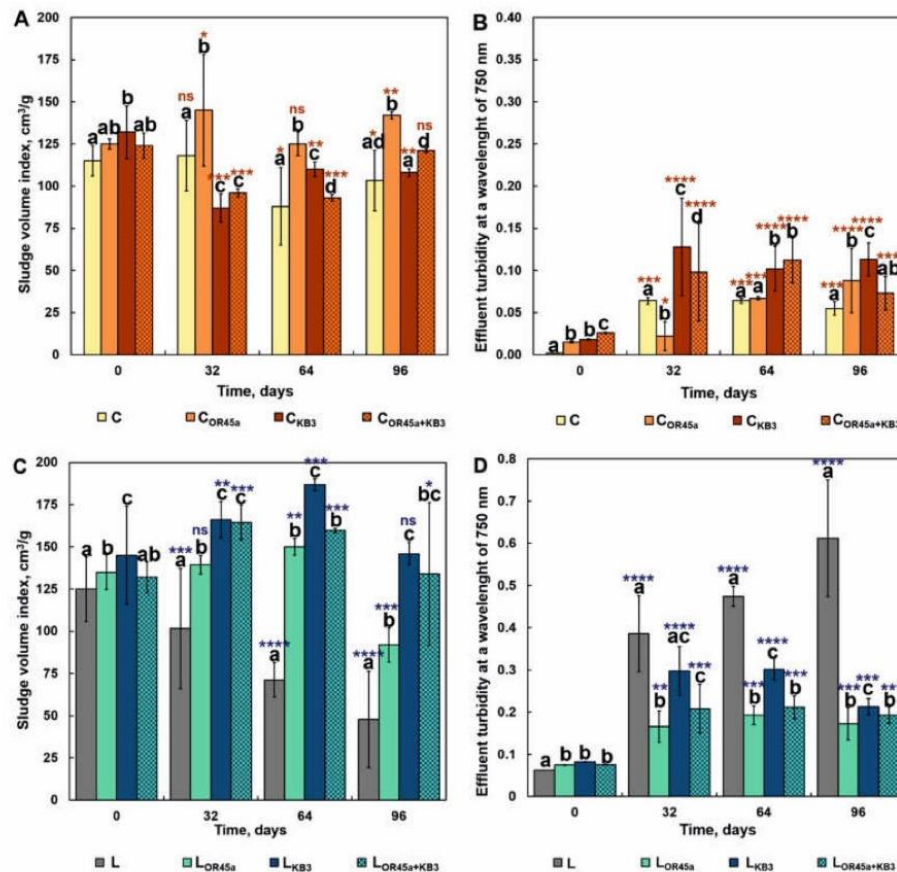


Figure 3. Changes in the sludge volume index and wastewater quality in the noninoculated and bioaugmented AS, fed only with the synthetic wastewater (A,B) and cotreated with the phenolic landfill leachate (C,D). The treatments are separated among themselves in each stage. The values that are indicated by different lower case letters are statistically significant. The changes in the SBRs during the wastewater treatment are indicated by asterisks.

In this study, the values of effluent turbidity were used to evaluate its quality and the sludge compaction. It was found that the treatment of the leachate-laden wastewater led to the rapid increase in the turbidity of effluent generated in the bioreactor L (Figure 3D). In turn, effluent produced in the bioreactor C was sharply less turbid (Figure 3B). Interestingly, the increase in effluent turbidity was observed during the wastewater treatment in all SBRs inoculated with *Pseudomonas* strains.

Considering the pH value, the concentration of the DO, COD, N-NH₃, and phenolic compounds in effluents produced in the SBRs during the treatment of the leachate-laden wastewater (Table S2), it can be concluded that the quality of effluents deteriorated with the increase in the leachate concentration in wastewater. However, significantly lower values of wastewater quality indices were obtained for the bioreactors L_{OR45a} (88.03), L_{KB3} (72.16), and L_{OR45a+KB3} (78.99) than for the bioreactor L (249.76).

3.2. The Impact of Wastewater Composition and Bioaugmentation on the Biomass Concentration and Number of Heterotrophic Bacteria in the AS

Through the experiment, the MLSS was found to increase from 3.1 g/L to 4.1 g/L, 4.8 g/L, 4.3 g/L, and 4.7 g/L after 96 days of the wastewater treatment process in the bioreactor C, C_{OR45a}, C_{KB3}, and C_{OR45a+KB3}, respectively (Figure 4A). After the increase in the leachate concentration in wastewater from 3.5% to 5.5% and then to 12.5%, the gradual reduction in the MLSS to 2.4 g/L and then 1.9 g/L was

recorded in the bioreactor L. Similarly, the significant reduction in the MLSS concentration was also observed in the bioreactor L_{OR45a}. Contrary, in the bioreactors L_{KB3} and L_{OR45a+KB3} the increase in the leachate concentration was accompanied by the increase in the MLSS value. The changes in total sludge concentration have been reflected in the fluctuations in the number of heterotrophic bacteria in the AS (Figure 4B,D). The presence of phenol-degrading bacteria in the control AS showed a slightly higher abundance of these microorganisms in the bioaugmented SBRs (Figure 4B,D). However, wastewater spiked with the leachate promoted the growth of phenol-utilizing bacteria in all bioaugmented SBRs (Figure 4D).

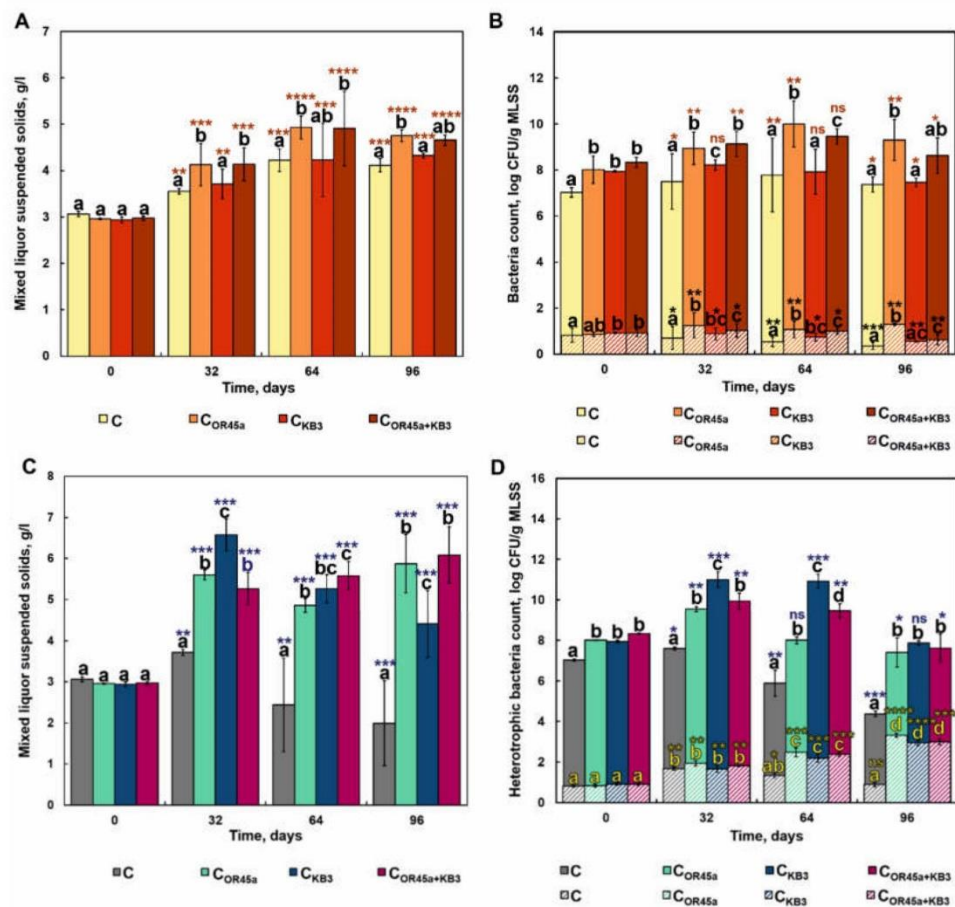


Figure 4. Changes in the mixed liquor suspended solids, number of heterotrophic microorganisms (fulfilled bars), and phenol-degrading bacteria (stripped bars) in the noninoculated and bioaugmented AS, fed only with synthetic wastewater (A,B) and cotreated with phenolic landfill leachate (C,D). The treatments are separated among themselves in each stage. The values that are indicated by different lower case letters are statistically significant. The changes in SBRs during the wastewater treatment are indicated by asterisks.

Herein, the active biomass index above 55% and stress biomass index below 25% were observed during the synthetic wastewater treatment in the control SBRs (Figure 5A). On the other hand, the constant exposure of the noninoculated AS to the leachate contributed to the decrease in active biomass index by 53%, which was simultaneously correlated with the increase in stress biomass index for this ecosystem to 76%. Inoculation of *Pseudomonas* strains into the SBRs fed with the leachate ensured

active biomass index to be maintained at the level of 47–58% (Figure 5B) and provided a reduction of stress in this ecosystem to 32–45%.

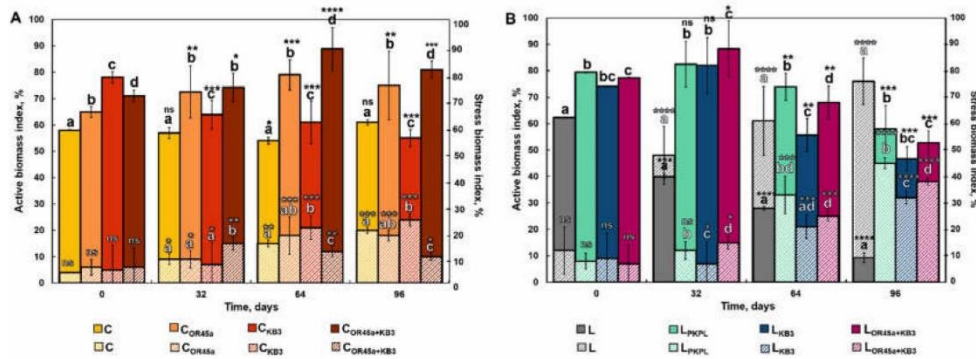


Figure 5. Changes in the active biomass index and stress biomass index for the noninoculated and bioaugmented AS fed only with the synthetic wastewater (A) and cotedreated with the phenolic landfill leachate (B). The treatments are separated among themselves in each stage. The values that are indicated by different lower case letters are statistically significant. The changes in SBRs during the wastewater treatment are indicated by asterisks.

3.3. The Impact of Wastewater Composition and Bioaugmentation on the Enzymatic Activity of the Bioreactors

The effect of wastewater composition and bioaugmentation on the activities of dehydrogenases, nonspecific esterases, and catalase in SBRs is shown in Figure 6. It was found that the dehydrogenase activity in the bioreactor L was extremely affected by the presence of the leachate and decreased by 76% during 96 days of the wastewater treatment (Figure 6D). The increase in the leachate concentration from 3.5% to 12.5% resulted also in the reduction in respiratory activity in the bioaugmented SBRs in the range from 18% to 27%. By comparison, the dehydrogenase activity in the control SBRs maintained at a constant level (Figure 6A). It was found that the nonspecific esterase activity in the bioreactor L was less sensitive to the leachate (Figure 6E). Nevertheless, the increase in the leachate concentration in wastewater resulted in a rapid decline in the esterase activity by 59%. Simultaneously, the esterase activity in all control SBRs were almost 3–4-times higher (Figure 6B). Regardless of the leachate concentration, the nonspecific esterase activities measured in all SBRs exposed to the leachate were higher than in the bioreactor L. This study also showed that the presence of 3.5% and 5.5% of the leachate in wastewater stimulated the catalase activity in the bioreactor L (Figure 6F). Nevertheless, a significantly greater increase in the catalase activity was observed in the bioaugmented SBRs (Figure 6C,F). The maximum catalase activity was reached after 64 days of wastewater treatment in the bioreactor L_{OR45a} . In general, the presence of the leachate in wastewater significantly affected the metabolism of microorganisms in the bioreactor L, which was reflected by the decrease in the SOUR by 53% (Table S1). Conversely, the bacterial respiration rate in the bioreactor C increased during 96 days of wastewater treatment by 11%. The introduction of *Pseudomonas* strains into the AS positively affected the SOUR in all SBRs.

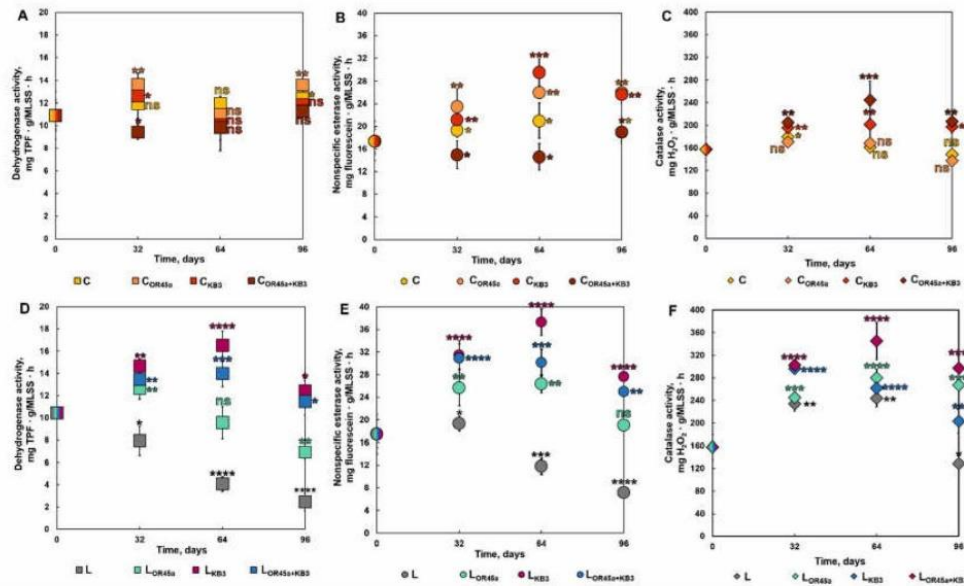


Figure 6. Changes in the activity of dehydrogenase, nonspecific esterase, and catalase in the noninoculated and bioaugmented AS fed only with the synthetic wastewater (A–C) and cotreated with the phenolic landfill leachate (D–F). The changes in SBRs during the wastewater treatment are indicated by asterisks.

3.4. The Impact of Wastewater Composition and Bioaugmentation on the Functional Capacity of Microorganisms in the AS

To compare the microbial activity in the SBRs, the EcoPlate™ functional capacity indices and kinetic parameters were computed at the beginning (0d) and after 32, 64, and 96 days of the experiment (Table S3). It was found that the constant feeding of the AS with the increasing concentration of the leachate resulted in a decrease of the Shannon–Weaver diversity index for the bioreactor L as compared to its value for the bioreactor C. In turn, the continuous exposure of the bioaugmented SBRs to the leachate affected the microbial functional capacity to a lesser extent.

The decrease in the microbial functional capacity in the SBRs fed with the leachate was correlated with the decrease in maximum microbial activity in the AS. Once again, the lowest maximal activity (A_{max}) was recorded for the bioreactor L (0.37), whereas the microbial activities in the bioaugmented SBRs were higher with a value of 0.90, 0.93, and 1.03 for the L_{OR45a}, L_{LKB3}, and L_{OR45a+K33}, respectively.

The continuous cotreatment of the leachate-laden wastewater in the noninoculated SBRs strongly affected the ability of the AS microorganisms to utilize carbon sources on the Biolog® EcoPlate™ (Tables S3 and S4). After the exposure of the AS to 12.5% of the leachate, microorganisms were able to use only 33.87% among the available substrates (Table S4). It was found that the bioaugmentation of the SBRs fed with the leachate allowed to maintain the high utilization efficiency of the EcoPlate™ compounds at the level of 67.74%, 73.13%, and 80.65%, in the bioreactors L_{OR45a}, L_{LKB3}, and L_{OR45a+K33}, respectively. Moreover, the addition of *Pseudomonas* strains into the control SBRs increased the utilization efficiency of carbon sources to 100%.

It was shown that the AS in the SBRs fed with the leachate achieved the highest utilization efficiency of the nitrogen-containing substrates of 41.50% (Table S4). Instead, the ability of the autochthonous microorganisms to use nitrogen compounds did not change significantly in the control SBRs. Interestingly, the cotreatment of wastewater with the leachate contributed to the gradual decrease in the utilization efficiency of the phosphorus compounds. It is worth emphasizing that the utilization of phosphorus sources in the AS bioaugmented with *P. putida* OR45a increased along with the increase

of the leachate concentration. The opposite phenomenon was observed in the SBRs inoculated with *P. putida* KB3 and mixed microbial consortium.

The pattern of different carbon sources utilized by the AS microbiome during the synthetic wastewater treatment and cotreatment with the leachate is presented in Figure 7. Compared to the bioreactor C, the presence of the leachate in wastewater primarily affected the utilization efficiency of carbohydrates, amino acids, surfactants and polymers in the bioreactor L (Figure 7A,B). After 96 days, a sharp decrease in the intensity of the usage of carbohydrates from 25.30% to 1.74% and rise in the intensity of the amino acids and surfactants usage from 15.66% to 43.51% and from 9.50% to 18.82% was recorded in the bioreactor L, respectively (Figure 7B). Additionally, microorganisms in this bioreactor could not use the polymers as carbon sources. Contrary, bacteria in the bioreactors L_{OR45a} , L_{KB3} , and $L_{OR45a+KB3}$ were characterized by the higher utilization of carboxylic acids of 25–35%, phenolic acids of 5–10% and polymers of 2–3%.

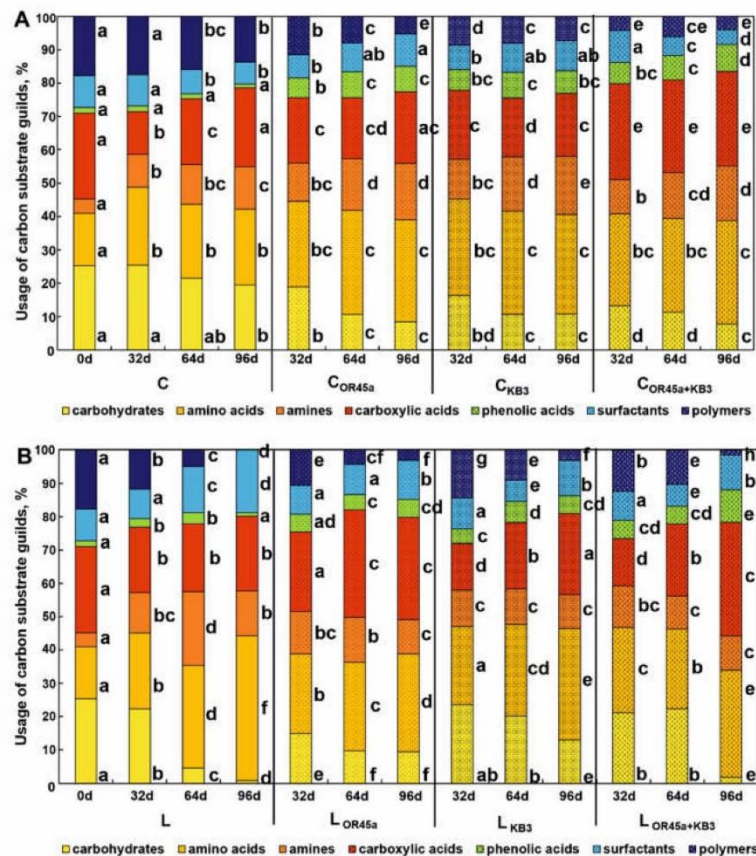


Figure 7. Changes in the utilization of carbon sources in the noninoculated and bioaugmented AS, fed only with the synthetic wastewater (A) and cotreated with the phenolic landfill leachate (B). The treatments are separated among themselves and the changes in the SBRs during the wastewater treatment are indicated by different lower case letters.

3.5. Bioaugmentation Potential Analysis of *P. putida* OR45a, *P. putida* KB3, and their Consortium

The effectiveness of bioaugmentation strategy was evaluated separately based on the operational parameters of wastewater treatment, the quality of the AS and generated effluent, enzymatic activity and functional capacity indices (Figure 8). The cluster analysis indicated that the bioaugmentation of the AS with *P. putida* OR45a contributed in general to the improvement of the respiratory activity of

microorganisms, ammonia removal efficiency, and settling abilities of the sludge (Figure 8A). In turn, inoculation of the bioreactor with *P. putida* KB3 stimulated the microbial enzymatic activity, MLSS, functional capacity, removal of contaminants as well as the utilization of carbon and phosphorus sources. The introduction of both *Pseudomonas* strains into the SBRs also resulted in the improvement of the AS respiratory and catalase activity, MLSS, and functional capacity. Instead, it did not contribute to the increase in the removal efficiency of contaminants in the AS but led to a reduction in the biomass stress index.

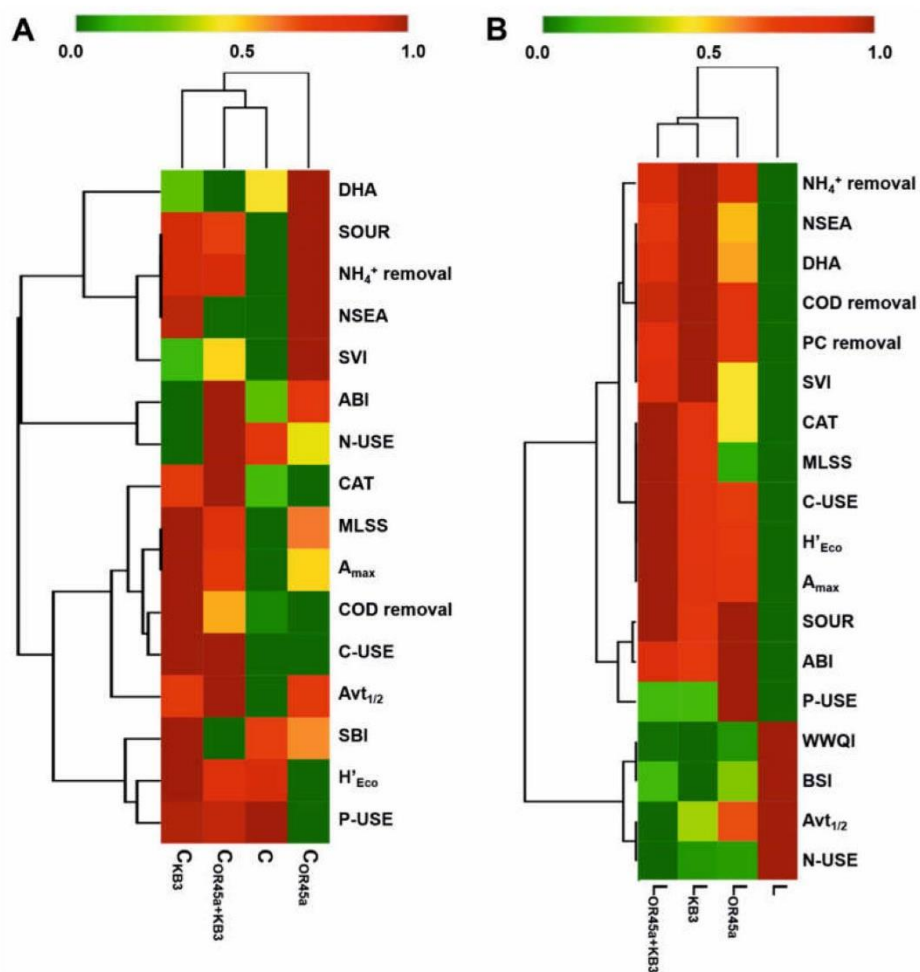


Figure 8. Heat maps and cluster analyses based on significant Spearman's rank correlation coefficients calculated for the operational parameters of the SBRs, functional capacity indices, microbial biomass, and activity determined after 96 days in the noninoculated and bioaugmented AS, fed only with the synthetic wastewater (A) and cotreated with the phenolic landfill leachate (B).

Analysis of the conditions in the AS fed with the leachate after 96 days showed a strong correlation between the bioaugmentation and improvement of the leachate-laden wastewater treatment (Figure 8B). However, the inoculation of the AS with *P. putida* KB3 and the mixed microbial consortium was slightly more effective than the bioaugmentation with *P. putida* OR45a, which led to the significant improvement of the enzymatic activity in this ecosystem and contributed to the generation of better-quality effluents.

4. Discussion

The controlled and proper treatment of the landfill leachate are indispensable to minimize the toxicity of this effluent before its discharge into the environment. To ensure the preservation of the public health and ecosystem, the remediation and disposal of the landfill leachate should proceed in an environmentally safe approach. Although both physical and chemical methods have been successfully applied to treat the landfill leachate within a short duration, these techniques are usually expensive and may lead to the unexpected secondary pollution of the environment [8–10]. Therefore, the biological methods are widely considered to be more appropriate for long term treatment of the landfill leachate [44]. However, biological processes often deal with system instability and deterioration of its performance under different stresses [13]. Although the bioaugmentation has proven to be a valuable technique to improve the operation performance and recovery in the biological systems for wastewater treatment, studies that decipher the impact of this strategy on the landfill leachate treatment in the SBRs are scarce.

In the previous study, we described *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 strains as suitable candidates for the bioremediation of wastewater spiked with the landfill leachate [26]. Herein, these bacterial strains introduced into the SBRs fed with the phenolic landfill leachate significantly improved the removal efficiency of contaminants by over 30%. This corresponded simultaneously with the generation of good-quality effluent with a quality index of 57–88 and slightly alkaline pH. On the other hand, the gradual decrease in the removal efficiency of the COD from 95% to 45% in noninoculated bioreactor exposed to the leachate resulted in the formation of very poor-quality effluent with a quality index of 250 and strongly alkaline pH. The pH of wastewater is considered to be among the most critical factors for the stable operation of sewage plants because it affects the strength and surface charge of the sludge flocs [45]. It can be concluded that the bioaugmentation of the AS with *Pseudomonas* strains made it possible to maintain the system stability because these bacteria positively affected the microbial biodegradation of the contaminants in the sewage and thus helped to maintain stable pH conditions. This observation may indirectly lead to the conclusion that there were no antagonistic relationships between inoculated strains as well as between the exogenous bacteria and autochthonous microorganisms in the AS. Throughout this study, taking into account the removal efficiencies of phenols, the bioaugmented SBRs can be ordered as follows: $L_{KB3} > L_{OR45a+KB3} = L_{OR45a}$. It is also worth emphasizing that the bioaugmentation of the AS with *P. putida* KB3 was slightly more efficient in terms of the utilization of contaminants in the leachate (95%) than the inoculation of the AS with *P. putida* OR45 (90%) as well as with mixed consortium of these bacteria (90%). In turn, autochthonous microorganisms in the AS were not able to completely remove phenolic compounds present in the leachate, in particular 4-methylphenol, 3,4-dimethylphenol, and 2,3,5-trimethylphenol. Moreover, their degradative potential towards phenolic compounds decreased along with the increase in the leachate concentration.

The landfill leachate is often characterized by the high strengths of ammonia nitrogen, which toxicity may inhibit the growth and activity of microorganisms in the AS and thus suppress the biodegradation process [46]. As previously described, *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 withstood high concentrations of the ammonia up to 600 mg/L and 900 mg/L, respectively [26]. Herein, the removal of N-NH₃ (88–91%) was much more improved in the bioreactors L_{OR45a} , L_{KB3} , and $L_{OR45a+KB3}$ as compared to the noninoculated bioreactor L (64%). These results also confirmed our previous assumptions that *P. putida* KB3 may exhibit a higher ability to remove the N-NH₃ than *P. putida* OR45a. Similar to the removal efficiency of the COD and phenolic compounds, no synergy between bacteria inoculated into the AS fed with the leachate towards the removal of N-NH₃ was observed. The potential of other bacteria *Bacillus cereus* Jlu and *Enterococcus casseliflavus* Jlu in the bioaugmentation of wastewater spiked with the mature landfill leachate originated from the municipal landfill site located near Chang Chun city (China) was assessed by Yu et al. [19]. Their results showed that the removal efficiencies of COD achieved 86% and 90% in effluents inoculated with *B. cereus* Jlu and *E. casseliflavus* Jlu, respectively. In turn, the removal efficiency of N-NH₃ was comparable in both cases and reached

about 50%. By comparison, the autochthonous bacteria were able to remove 70% of the COD and 40% of the N-NH₃ [19]. Successful bioaugmentation of the landfill leachate from the pond at the Bukit Beruntung landfill (Malaysia) with the *Bacillus salmalaya* 139SI strain was also demonstrated by Dadrasnia et al. [47], who observed the decrease in the COD and N-NH₃ by 91% and 80%, respectively, as compared to the nonbioaugmented leachate where removal efficiency of both contaminants was slightly above 30%.

The SOUR is a promising indicator used for characteristics of the AS because it describes the respiration rate of microorganisms, which is strongly related to the microbial activity and vitality [48,49]. Therefore, it can be applied for the control and identification of potential instabilities of the AS systems [50,51]. In this study, the disruption of the performance of nonbioaugmented system spiked with the leachate was observed by the gradual decrease in the SOUR for the AS by 53% along with the increase in the leachate concentration in wastewater. By comparison, the values of this parameter were almost 2–3 times higher for the bioaugmented SBRs fed with the leachate as well as for the inoculated control bioreactors. A similar phenomenon was observed by Eichner et al. [52] who found that microorganisms in the noninoculated control bioreactor collapsed after the shock load of contaminants, which resulted in the oxygen uptake decrease. In research by Contreras et al. [53], the oxygen uptake rate was used for the evaluation of phenol toxicity towards nonacclimated and acclimated autochthonous microorganisms in the AS. It was stated that phenol was toxic to microorganisms, which were not previously adapted to its presence in wastewater, which resulted in a decrease in the microbial respiration by 75% as the phenol concentration increased. Contrary, the respiration of acclimated sludge microorganisms increased within the tested phenol concentrations.

The activity of microorganisms in the AS is extremely important for the appropriate functioning and stability of this ecosystem. However, this parameter is hardly ever considered during the evaluation of the effect of the leachate on the sludge condition. Herein, the impact of the leachate on the activities of dehydrogenase, nonspecific esterase, and catalase was evaluated, as these enzymes play a key role in the metabolism of contaminants in wastewater. The results of the respiratory activity of the sludge were consistent with the outcomes of the microbial enzymatic activity in the SBRs. It was found that the presence of leachate in wastewater affected most the activity of enzymes in the nonbioaugmented bioreactor contributing to the reduction in the activity of dehydrogenases, nonspecific esterases and catalase by 76%, 59%, and 18%, respectively. It can be concluded that the dehydrogenases were the most sensitive enzymes to the toxic components in the leachate. A similar phenomenon was reported by Yao et al. [54] who stated that among five enzymes measured in the AS contaminated with tetrahydrofuran, the activity of dehydrogenases was close to detection level limits and was nearly completely inhibited. This observation was correlated with a significant decrease in the diversity of the AS microbial communities.

The success of bioaugmentation depends, to a large degree, on the ability of the introduced bacteria to survive and display their activities in the AS environment. Our study showed that the enzymatic activity in the bioaugmented AS was higher during the leachate wastewater treatment than in the nonbioaugmented system. The increase in the microbial activity in the inoculated SBRs loaded with the leachate correlated with the increase in the sludge biomass as well as the number of heterotrophic microorganisms, while the gradual reduction in these parameters was observed in the nonbioaugmented bioreactor. It can be concluded that the compounds present in the leachate may not be used for the maintenance and growth of autochthonous microorganisms in the AS but they can be utilized by the introduced *Pseudomonas* strains. This could be indicated by the higher increase in the growth of phenol-degrading bacteria in the bioaugmented AS. The positive correlation between the sludge biomass increase and the efficiency of contaminants degradation in the bioaugmented AS was also observed by Yao et al. [55], who found that tetrahydrofuran was completely removed from wastewater when the sludge biomass increased from 2.1 g/L to 7.3 g/L.

The high metabolic capacity of the AS microbiome is considered to be extremely important for efficient wastewater treatment in sewage plants [56]. It was found that microorganisms in the SBRs fed

with leachate were less metabolically active than bacteria in the control bioreactors. Nevertheless, the addition of *Pseudomonas* strains into the SBRs allowed to maintain higher microbial activity than in the bioreactor filled with noninoculated biomass, which contributed to the increase in functional diversity in the bioaugmented systems. Throughout this study, the microbial activity and functional capacity in the bioaugmented SBRs can be ordered as follows: $L_{OR45a+KB3} > L_{OR45a} = L_{KB3}$. The addition of exogenous bacteria into the AS is expected to lead to changes in microbial communities [57]. As described by Fang et al. [58] some microorganisms introduced into the bioreactor might gain constant proliferation, exerting a key role in the removal of pollutants. Here, the low functional diversity of 1.66 was correlated with a lack of ability of microbial communities to utilize specific compounds, in particular, the phosphorus sources. It was found that the occurrence of the leachate in wastewater led to the metabolic specialization of the AS microorganisms. It can be concluded that the changes in the utilization patterns of carbon sources for the bioaugmented SBRs can be the result of the *Pseudomonas* strains persistence in the AS, which is evidenced by the increase in the utilization capacity of phenolic compounds and carboxylic acids in these systems.

The novelty of this work was mainly related to the use of the active biomass and stress biomass indices to assess the impact of the leachate as well as bioaugmentation on the AS. The study performed by Archibald et al. [59] revealed that the ATP measurements provided useful monitoring of the proportion of viable cells and were toxicity indicators in the AS process. The research by Pistelok et al. [42] showed that the ATP analyses helped in the quick assessment of wastewater plant effectiveness and could complement other indicators e.g., organic carbon, total suspended solids, biochemical and chemical oxygen demand. Herein, the presence of the leachate in wastewater constituted a strong stress factor for microorganisms in the AS. It was found that the bioreactor did not work properly when the biomass stress index was higher than 50%. Our results indicated that the addition of exogenous bacteria into the AS alleviated the toxic effect of the leachate and thus reduced the stress in this environment.

The condition of the AS in the tested SBRs was evaluated by the measurement of the sludge volume index. It is worth emphasizing that the bioaugmentation improved the settling properties and quality of the AS in the SBRs. This can be explained by good coaggregation abilities exhibited by the bioaugmentation candidates [26]. The improvement of the AS settling properties via the bioaugmentation with *Halobacter halobium* was also described by Kargi et al. [60]. On the other hand, the low value of the sludge volume index for the bioreactor L could indicate a considerable dispersion of the AS flocs, which could be correlated with the increase in the turbidity of supernatant liquid.

Multivariate analysis performed in this work allowed to establish important relationships between the bioaugmentation and operational parameters of the wastewater treatment process in the AS. Although it was indicated that the presence of the *Pseudomonas* strains was responsible for the alleviating of the variations in the AS, the inoculation of the bioreactor with *P. putida* KB3 as well as with mixed microbial consortium stimulated many more processes in the SBRs, e.g., the increase in microbial enzymatic activity, MLSS and COD removal efficiency. On the other hand, the introduction of *P. putida* OR45a into the bioreactor contributed to the increase in the utilization of phosphorus sources. Combining physicochemical and biological analyses allowed us to identify the general effect of the bioaugmentation on the AS condition and SBRs performance.

5. Conclusions

Herein, we explored the bioaugmentation potential of two newly isolated *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 for enhancing the biodegradability of the phenolic landfill leachate in the AS. Our results showed that both strains have the potential to improve the efficiency of the conventional biological treatment of the phenolic landfill leachate and can alleviate the toxic impact of the leachate-spiked effluent on autochthonous microorganisms. However, it should be noted that the inoculation of the AS with *P. putida* KB3 was more effective in the improvement of the bioreactor operation than its bioaugmentation with *P. putida* OR45a and bacterial consortium. This was manifested in the significant improvement of the removal efficiency of phenolic compounds, COD, and N-NH₃ and contributed

to the increase in microbial enzymatic activity and generation of better-quality effluent. Therefore, *P. putida* KB3 strain can be considered as having the best potential to improve the efficiency of the conventional sewage plant dealing with the phenolic landfill leachate. Our research also emphasizes the successful combination of standard operational parameters with simple and more accurate methods (e.g., analyses of the ATP concentration, microbial metabolic activity, and functional potential) instead of focusing on the expensive genetic analyses of microbial community structure, as they provide early warning of the performance status of the AS and sewage plant.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4441/12/3/906/s1>, Table S1: The changes in the removal efficiency of the COD and N-NH₃, pH and SOUR values in the non-inoculated and bioaugmented SBRs during 96 days of the wastewater treatment; Table S2: The changes in the concentration of phenolic compounds and wastewater quality index in the non-inoculated and bioaugmented SBRs fed with the synthetic wastewater and phenolic landfill leachate during 96 days; Table S3: The values of functional capacity indices and kinetic parameters (A_{max} and $A_{vt1/2}$) for the non-inoculated and bioaugmented AS, fed only with the synthetic wastewater and cotreated with the phenolic landfill leachate during 96 days; Table S4: The values of carbon, nitrogen and phosphorus usage indices for the non-inoculated and bioaugmented AS, fed only with the synthetic wastewater and cotreated with the phenolic landfill leachate during 96 days.

Author Contributions: Conceptualization, J.M. and A.M.; formal analysis, J.M., A.P., and J.Ż.; data curation, J.M.; writing—original draft preparation, J.M. and A.M.; writing—review and editing, A.M.; visualization, J.M.; supervision, A.M.; project administration, J.M. and A.M.; funding acquisition, J.M. and A.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The paper was prepared in connection with the work done under the project granted based on decision DEC-2016/23/N/NZ9/00158 and financed by the National Science Centre (Poland).

Acknowledgments: The research was performed due to the courtesy of the Chorzowski-Świętochłowickie Municipal Water and Sewage Company LLC and the Head of Wastewater Treatment Plant Piotr Banaszek. The authors are also very grateful to Izabela Greń for helping with the analysis of phenolic compounds in wastewater and Katarzyna Malarz for helping with the analysis of ATP in the activated sludge.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. European Commission. *Directive 2008/98/EC of the European Parliament and of the Council of 19 November 2008 on Waste and Repealing Certain Directives (Text with EEA Relevance)*; OJ L 312; European Commission: Brussel, Belgium, 2008; pp. 3–30.
2. Renou, S.; Givaudan, J.G.; Poulain, S.; Dirassouyan, F.; Moulin, P. Landfill leachate treatment: Review and opportunity. *J. Hazard. Mater.* **2008**, *150*, 468–493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Brennan, R.B.; Healy, M.G.; Morrison, L.; Hynes, S.; Norton, D.; Clifford, E. *Suitability of Municipal Wastewater Treatment Plants for the Treatment of Landfill Leachate*; EPA Research Report (2013-W-FS-13); Environmental Protection Agency: Wexford, Ireland, 2017.
4. Moody, C.M.; Townsend, T.G. A comparison of landfill leachates based on waste composition. *Waste Manag.* **2017**, *63*, 267–274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Da Costa, F.M.; Daflon, S.D.A.; Bila, D.M.; da Fonseca, F.V.; Campos, J.C. Evaluation of the biodegradability and toxicity of landfill leachates after pretreatment using advanced oxidative processes. *Waste Manag.* **2018**, *76*, 606–613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Aziz, S.Q.; Aziz, H.A.; Yusoff, M.S.; Mohaheri, S. Removal of phenol and other pollutants from different landfill leachates using powdered activated carbon SBR supplemented technology. *Environ. Monit. Assess.* **2012**, *184*, 6147–6158. [[CrossRef](#)]
7. Kapelewska, J.; Kotowska, U.; Wiśniewska, K. Determination of personal care products and hormones in leachate and groundwater from Polish MSW landfills by ultrasound-assisted emulsification microextraction and GC-MS. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2016**, *23*, 1642–1652. [[CrossRef](#)]
8. Lippi, M.; Bellas, M.B.R.G.; Mendez, G.P.; Cardoso, R.A.F. State of art of landfill leachate treatment: Literature review and critical evaluation. *Ciência e Natura J.* **2018**, *40*. [[CrossRef](#)]
9. Kalka, J. Landfill leachate toxicity removal in combined treatment with municipal wastewater. *Sci. World J.* **2012**, *2012*, 202897. [[CrossRef](#)]

10. Seow, T.W.; Lim, C.K. A mini review on landfill leachate treatment technologies. *Int. J. Appl. Environ. Sci.* **2015**, *10*, 1967–1979.
11. Luo, H.; Zheng, Y.; Cheng, Y.; He, D.; Pan, X. Recent advances in municipal landfill leachate: A review focusing on its characteristics, treatment, and toxicity assessment. *Sci. Total Environ.* **2020**, *703*, 135468. [[CrossRef](#)]
12. Michalska, J.; Greń, I.; Żur, J.; Wasilkowski, D.; Mrozik, A. Impact of the biological cotreatment of the Kalina pond leachate on laboratory sequencing batch reactor operation and activated sludge quality. *Water* **2019**, *11*, 1539. [[CrossRef](#)]
13. Zhang, Q.Q.; Yang, G.F.; Zhang, L.; Zhang, Z.Z.; Ming, G.; Jin, R.C. Bioaugmentation as a useful strategy for performance enhancement in biological wastewater treatment undergoing different stresses: Application and mechanisms. *Crit. Rev. Env. Sci. Tech.* **2017**, *47*, 1877–1899. [[CrossRef](#)]
14. Dueholm, M.S.; Marques, I.G.; Karst, S.M.; D’Imperio, S.; Tale, V.P.; Lewis, D.; Nielsen, P.H.; Nielsen, J.L. Survival and activity of individual bioaugmentation strains. *Bioresour. Technol.* **2015**, *186*, 192–199. [[CrossRef](#)]
15. Nzila, A.; Razzak, S.A.; Zhu, J. Bioaugmentation: An emerging strategy of industrial wastewater treatment for reuse and discharge. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2016**, *13*, 846. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Quan, X.; Shi, H.; Liu, H.; Wang, J.; Qian, Y. Removal of 2,4-dichlorophenol in a conventional activated sludge system through bioaugmentation. *Process Biochem.* **2004**, *39*, 1701–1707. [[CrossRef](#)]
17. Jiang, H.L.; Tay, J.H.; Maszenian, A.M.; Tay, S.T.L. Enhanced phenol biodegradation and aerobic granulation by two coaggregating bacterial strains. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 6137–6142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Brenner, K.; You, L.; Arnold, F.H. Engineering microbial consortia: A new frontier in synthetic biology. *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 483–489. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Yu, D.; Yang, J.; Teng, F.; Feng, L.; Fang, X.; Ren, H. Bioaugmentation treatment of mature landfill leachate by new isolated ammonia nitrogen and humic acid resistant microorganism. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *24*, 987–997. [[CrossRef](#)]
20. Rojo, F. Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: Optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol. Rev.* **2010**, *34*, 658–684. [[CrossRef](#)]
21. Nogales, J.; Mueller, J.; Gudmundsson, S.; Canalejo, F.J.; Duque, E.; Monk, J.; Feist, A.M.; Ramos, J.L.; Niu, W.; Palsson, B.O. High-quality genome-scale metabolic modelling of *Pseudomonas putida* highlights its broad metabolic capabilities. *Environ. Microbiol.* **2020**, *22*, 255–269. [[CrossRef](#)]
22. Paliwal, V.; Raju, S.C.; Modak, A.; Phale, P.S.; Purohit, H.J. *Pseudomonas putida* CSV86: A candidate genome for genetic bioaugmentation. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e84000. [[CrossRef](#)]
23. Yu, F.B.; Ali, S.W.; Guan, L.B.; Li, S.P.; Zhou, S. Bioaugmentation of a sequencing batch reactor with *Pseudomonas putida* ONBA-17, and its impact on reactor bacterial communities. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *176*, 20–26. [[CrossRef](#)]
24. Monsalvo, V.M.; Tobajas, M.; Mohedano, A.F.; Rodriguez, J.J. Intensification of sequencing batch reactors by cometabolism and bioaugmentation with *Pseudomonas putida* for the biodegradation of 4-chlorophenol. *J. Chem. Technol. Biot.* **2012**, *87*, 1270–1275. [[CrossRef](#)]
25. Surkatti, R.; El-Naas, M. Biological treatment of wastewater contaminated with *p*-cresol using *Pseudomonas putida* immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel. *J. Water Process Eng.* **2014**, *1*, 84–90. [[CrossRef](#)]
26. Michalska, J.; Piński, A.; Żur, J.; Mrozik, A. Selecting bacteria candidates for the bioaugmentation of activated sludge to improve the aerobic treatment of landfill leachate. *Water* **2020**, *12*, 140. [[CrossRef](#)]
27. Steiner, C.; Nolte, H.; Azzizan, A.; Krüger, M.; Denecke, M.; Rehoreka, A. Quantitative proteomics for monitoring microbial dynamics in activated sludge from landfill leachate treatment. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* **2019**, *5*, 268–276. [[CrossRef](#)]
28. EN ISO 5667-13:2011. *Water Quality—Sampling—Guidance on Sampling of Sludges*; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2011.
29. EN ISO 19458:2007P. *Water Quality—Sampling for Microbiological Analysis*; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2007.
30. Michalska, J.; Wojcieszynska, D.; Greń, I. Investigation of functional diversity and activated sludge condition using Biolog[®] system. *ACEE J.* **2016**, *1*, 119–126. [[CrossRef](#)]
31. Chojniak, J.; Wasilkowski, D.; Płaza, G.; Mrozik, A.; Brigmon, R. Application of Biolog microarrays techniques for characterization of functional diversity of microbial community in phenolic-contaminated water. *Int. J. Environ. Res.* **2015**, *9*, 785–794. [[CrossRef](#)]

32. APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*; American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation: Washington, DC, USA, 1999.
33. PN-ISO 6439:1994. *Water Quality—Determination of Phenol Index—4-Aminoantipyrine Spectrometric Methods after Distillation*; Polish Committee for Standardization: Warsaw, Poland, 1994. (In Polish)
34. Goodner, K.L. *Estimating Turbidity (NTU) from Absorption Data*; Synergy Inspiring Taste, Sensus Technical Note (SEN-TN-0010); Synergy Flavors: Hamilton, OH, USA, 2009; pp. 1–3.
35. Singh, R.P.; Nath, S.; Prasad, S.C.; Nema, A.K. Selection of suitable aggregation function for estimation of aggregate pollution index for river Ganges in India. *J. Environ. Eng.* **2008**, *134*, 689–701. [[CrossRef](#)]
36. EN ISO 8199:2010. *Water Quality—General Requirements and Guidance for Microbiological Examinations by Culture*; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2010.
37. Miksch, K. Application of dehydrogenase activity determinations in biodegradation of refinery sewage. *Gas Water Civ. Technol.* **1977**, *51*, 234–235.
38. Schumacher, T.E.; Eynard, A.; Chintala, R. Rapid cost-effective analysis of microbial activity in soils using modified fluorescein diacetate method. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 4759–4762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Yan, C.S. *Research Method for Soil Fertility*; Agriculture Press: Beijing, China, 1988; pp. 277–279.
40. Lim, J.W.; Tan, J.Z.; Seng, C.E. Performance of phenol-acclimated activated sludge in the presence of various phenolic compound. *Appl. Water Sci.* **2013**, *3*, 515–525. [[CrossRef](#)]
41. Järvik, O.; Kamenev, S.; Kasemets, K.; Kamenev, I. Effect of ozone on viability of activated sludge detected by Oxygen Uptake Rate (OUR) and adenosine-5'-triphosphate (ATP) measurement. *Ozone Sci. Eng.* **2010**, *32*, 408–416. [[CrossRef](#)]
42. Pistelok, F.; Pohl, A.; Wiera, B.; Stuczynski, T. Using the ATP test in wastewater treatment in the Silesia province. *Environ. Prot. Eng.* **2016**, *42*, 17–32. [[CrossRef](#)]
43. Nowak, A.; Mrozik, A. Degradation of 4-chlorophenol and microbial diversity in soil inoculated with single *Pseudomonas* sp. CF600 and *Stenotrophomonas maltophilia* KB2. *J. Environ. Manag.* **2018**, *215*, 216–229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Tajarudin, H.A.B.; Othman, M.F.B.; Serri, N.A.B.; Tamat, M.R.B. Biological treatment technology for landfill leachate. In *Waste Management: Concepts, Methodologies, Tools, and Applications*; IGI Global: Hershey, PA, USA, 2020; pp. 775–806.
45. Hong, E.; Yeneh, A.M.; Kayaalp, A.; Sen, T.K.; Ang, H.M.; Kayaalp, M. Rheological characteristic of municipal thickened excess activated sludge (TEAS): Impacts of pH, temperature, solid concentration and polymer dose. *Res. Chem. Intermediat.* **2016**, *42*, 6567–6585. [[CrossRef](#)]
46. Li, X.Z.; Zhao, Q.L. Inhibition of microbial activity of activated sludge by ammonia in leachate. *Environ. Int.* **1999**, *25*, 961–968. [[CrossRef](#)]
47. Dadrasnia, A.; Azirun, M.S.; Ismail, S.B. Optimal reduction of chemical oxygen demand and NH₃-N from landfill leachate using a strongly resistant novel *Bacillus salmalaya* strain. *BCM Biotechnol.* **2017**, *17*, 1–24. [[CrossRef](#)]
48. Tchobanoglous, G.; Burton, F.L.; Stensel, H.D. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*; Metcalf & Eddy, McGraw-Hill Education: New York, NY, USA, 2004.
49. Zubrowska-Sudol, M.; Walczak, J. Effects of mechanical disintegration of activated sludge on the activity of nitrifying and denitrifying bacteria and phosphorus accumulating organisms. *Water Res.* **2014**, *61*, 200–209. [[CrossRef](#)]
50. Young, J. Oxygen Uptake Rate as a Monitoring and Control Parameter for Activated Sludge Processes. In Proceedings of the 1999 WEF/Indiana WPCA/Purdue University Conference on Industrial Waste, Alexandria, VA, USA, 21–22 May 1999.
51. Drewnowski, J. The impact of slowly biodegradable organic compounds on the oxygen uptake rate in activated sludge systems. *Water Sci. Technol.* **2014**, *69*, 1136–1144. [[CrossRef](#)]
52. Eichner, C.A.; Erb, R.W.; Timmis, K.N.; Wagner-Döbler, I. Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 102–109. [[CrossRef](#)]
53. Contreras, E.M.; Albertario, M.E.; Bertola, N.C.; Zaritzky, N.E. Modelling phenol biodegradation by activated sludges evaluated through respirometric techniques. *J. Hazard. Mater.* **2008**, *158*, 366–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

54. Yao, Y.; Lu, Z.; Min, H.; Gao, H.; Zhu, F. The effect of tetrahydrofuran on the enzymatic activity and microbial community in activated sludge from a sequencing batch reactor. *Ecotoxicology* **2011**, *21*, 56–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Yao, Y.; Lu, Z.; Zhu, F.; Min, H.; Bian, C. Successful bioaugmentation of an activated sludge reactor with *Rhodococcus* sp. YYL for efficient tetrahydrofuran degradation. *J. Hazard. Mater.* **2013**, *261*, 550–558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Xia, Y.; Wen, X.; Zhang, B.; Yang, Y. Diversity and assembly patterns of activated sludge microbial communities: A review. *Biotechnol. Adv.* **2018**, *36*, 1038–1047. [[CrossRef](#)]
57. Zhu, X.; Liu, R.; Liu, C.; Chen, L. Bioaugmentation with isolated strains for the removal of toxic and refractory organics from coking wastewater in a membrane bioreactor. *Biodegradation* **2015**, *26*, 465–474. [[CrossRef](#)]
58. Fang, F.; Han, H.; Zhao, Q.; Xu, C.; Zhang, L. Bioaugmentation of biological contact oxidation reactor (BCOR) with phenol-degrading bacteria for coal gasification wastewater (CGW) treatment. *Bioresour. Technol.* **2013**, *150*, 314–320. [[CrossRef](#)]
59. Archibald, M.; Méthot, M.; Young, F.; Paice, M.G. A simple system to rapidly monitor activated sludge health and performance. *Water Res.* **2001**, *35*, 2543–2553. [[CrossRef](#)]
60. Kargi, F.; Uygur, A. Improved nutrient removal from saline wastewater in an SBR by *Halobacter* supplemented activated sludge. *Environ. Eng. Sci.* **2005**, *22*, 170–176. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Table S1. The changes in the removal efficiency of the COD and N-NH₄⁺, pH and SOUR values in the non-inoculated and bioaugmented SBRs during 96 days of the wastewater treatment.

Bioreactor	Parameter Time (Days)	COD Removal (%)	N-NH ₄ ⁺ Removal (%)	pH	SOUR, mgO ₂ /g MLSS · h
C	0	94.56 ± 0.56 ^a	87.00 ± 0.85 ^a	6.99 ± 0.05 ^a	8.20 ± 0.22 ^a
	32	95.46 ± 1.32 ^a	87.10 ± 0.11 ^a	6.97 ± 0.03 ^a	9.82 ± 0.21 ^b
	64	94.36 ± 0.88 ^a	86.25 ± 0.15 ^a	7.07 ± 0.02 ^a	10.90 ± 0.14 ^c
	96	95.33 ± 1.46 ^a	86.13 ± 0.64 ^a	6.99 ± 0.05 ^a	9.14 ± 0.44 ^{ab}
COR45a	0	94.56 ± 0.56 ^a	87.00 ± 0.85 ^a	6.86 ± 0.05 ^a	8.27 ± 0.19 ^a
	32	96.19 ± 3.48 ^{ab}	89.70 ± 0.17 ^a	6.99 ± 0.02 ^a	10.56 ± 0.35 ^c
	64	94.46 ± 2.71 ^a	87.04 ± 0.82 ^a	7.19 ± 0.01 ^a	11.41 ± 0.02 ^{cd}
	96	95.02 ± 1.55 ^a	88.13 ± 0.82 ^a	7.20 ± 0.12 ^b	11.81 ± 0.04 ^d
CKB3	0	94.56 ± 0.56 ^a	87.00 ± 0.85 ^a	7.00 ± 1.03 ^a	8.29 ± 0.02 ^a
	32	96.12 ± 0.34 ^{ab}	96.17 ± 0.31 ^b	6.95 ± 0.01 ^a	11.54 ± 0.38 ^{cd}
	64	96.58 ± 2.73 ^{ab}	95.69 ± 0.07 ^b	7.25 ± 0.22 ^b	11.10 ± 0.28 ^c
	96	98.12 ± 1.99 ^b	97.04 ± 0.82 ^b	7.31 ± 0.21 ^b	11.67 ± 0.31 ^{cd}
COR45a+KB3	0	94.56 ± 0.56 ^a	87.00 ± 0.85 ^a	7.20 ± 0.35 ^b	8.31 ± 0.30 ^a
	32	95.67 ± 4.02 ^a	97.78 ± 0.63 ^b	6.99 ± 0.06 ^a	11.34 ± 0.16 ^{cd}
	64	96.72 ± 0.79 ^{ab}	96.97 ± 0.27 ^b	7.21 ± 0.02 ^b	10.98 ± 0.05 ^c
	96	98.63 ± 1.33 ^b	97.07 ± 0.27 ^b	7.28 ± 0.09 ^b	11.55 ± 0.07 ^{cd}
L	0	94.56 ± 0.56 ^a	87.00 ± 0.85 ^a	7.22 ± 0.11 ^b	8.39 ± 0.12 ^a
	32	73.28 ± 5.12 ^c	83.10 ± 0.48 ^a	8.14 ± 0.14 ^c	7.28 ± 0.06 ^c
	64	57.88 ± 4.13 ^d	75.25 ± 0.12 ^b	8.98 ± 0.01 ^d	5.69 ± 0.12 ^f
	96	45.08 ± 2.29 ^e	64.36 ± 0.09 ^c	9.47 ± 0.01 ^{de}	3.91 ± 0.08 ^g
LOR45a	0	94.56 ± 0.56 ^a	87.00 ± 0.85 ^a	7.92 ± 0.31 ^c	8.43 ± 0.32 ^a
	32	95.34 ± 4.25 ^a	94.98 ± 0.09 ^b	7.99 ± 0.14 ^c	10.22 ± 0.41 ^{bc}
	64	86.16 ± 3.33 ^f	94.34 ± 0.73 ^b	7.35 ± 0.05 ^b	8.13 ± 0.09 ^a
	96	79.27 ± 1.95 ^{cf}	88.14 ± 1.12 ^a	7.45 ± 0.02 ^b	7.88 ± 0.11 ^{ae}
LKB3	0	94.56 ± 0.56 ^a	87.00 ± 0.85 ^a	7.75 ± 0.03 ^{bc}	8.53 ± 0.53 ^a
	32	96.06 ± 2.66 ^b	95.06 ± 0.51 ^b	7.97 ± 0.14 ^c	9.53 ± 0.06 ^b
	64	91.13 ± 0.22 ^{af}	93.76 ± 0.07 ^b	8.11 ± 0.10 ^c	10.08 ± 0.01 ^b
	96	86.32 ± 1.36 ^f	90.57 ± 0.49 ^{ab}	8.19 ± 0.03 ^c	8.39 ± 0.01 ^a
LOR45a+KB3	0	94.56 ± 0.56 ^a	87.00 ± 0.85 ^a	8.46 ± 0.06 ^{cd}	8.27 ± 0.42 ^a
	32	95.47 ± 6.22 ^a	97.51 ± 0.27 ^b	8.11 ± 0.14 ^c	9.78 ± 0.24 ^b
	64	88.88 ± 2.83 ^{af}	93.12 ± 0.23 ^c	7.23 ± 0.05 ^b	9.03 ± 0.16 ^{ab}
	96	83.32 ± 5.01 ^{cf}	88.06 ± 0.23 ^a	7.48 ± 0.05 ^b	8.08 ± 0.16 ^a

COD—chemical oxygen demand, N-NH₄⁺ - ammonia nitrogen, SOUR—specific oxygen uptake rate. The values that are indicated by different lower case letters are statistically significant and referred to the changes in all SBRs during the wastewater treatment.

Table S2. The changes in the concentration of phenolic compounds and wastewater quality index in the non-inoculated and bioaugmented SBRs fed with the synthetic wastewater and phenolic landfill leachate during 96 days.

Bioreactor	L	LOR45a	LKB3	LOR45a+KB3
Time, Days	Wastewater Quality Index			
32 (end of the stage I)	102.55 ± 4.55 ^a	63.34 ± 11.66 ^b	57.12 ± 5.44 ^b	58.03 ± 22.42 ^b
64 (end of the stage II)	162.44 ± 11.03 ^a	71.12 ± 5.62 ^b	69.05 ± 0.14 ^b	66.57 ± 2.08 ^b
96 (end of the stage III)	249.76 ± 2.22 ^a	88.03 ± 2.09 ^b	72.16 ± 1.84 ^b	78.99 ± 15.33 ^c

Table S3. The values of functional capacity indices and kinetic parameters (A_{max} and $Avt_{1/2}$) for the non-inoculated and bioaugmented AS, fed only with the synthetic wastewater and cotreated with the phenolic landfill leachate during 96 days.

Bioreactor	Time, Days	Functional Capacity Indices and Kinetic Parameters					
		H'_{Eco}	S	G	AWCD	A_{max}	$Avt_{1/2}$
C	0	3.12 ± 0.07 ^{ab}	24.00 ± 0.00 ^a	0.36 ± 0.06 ^a	0.92 ± 0.05 ^a	1.35 ± 0.04 ^a	47 ± 1 ^a
	32	2.86 ± 0.09 ^c	20.67 ± 0.58 ^b	0.40 ± 0.10 ^a	0.79 ± 0.02 ^b	1.47 ± 0.10 ^b	55 ± 1 ^b
	64	3.01 ± 0.13 ^b	24.00 ± 0.00 ^a	0.46 ± 0.08 ^b	0.87 ± 0.11 ^c	1.27 ± 0.03 ^c	47 ± 1 ^a
	96	3.36 ± 0.76 ^a	28.00 ± 0.00 ^c	0.41 ± 0.09 ^a	0.75 ± 0.10 ^b	1.20 ± 0.21 ^c	48 ± 3 ^a
COR45a	32	2.92 ± 0.15 ^{bc}	21.00 ± 1.00 ^b	0.46 ± 0.12 ^b	0.76 ± 0.06 ^b	1.48 ± 0.02 ^b	52 ± 3 ^{ab}
	64	2.95 ± 0.08 ^b	20.50 ± 0.70 ^b	0.44 ± 0.02 ^{ab}	0.75 ± 0.08 ^b	1.30 ± 0.07 ^a	49 ± 1 ^a
	96	3.01 ± 0.04 ^b	28.00 ± 0.00 ^c	0.45 ± 0.01 ^b	1.08 ± 0.05 ^a	1.32 ± 0.22 ^a	46 ± 3 ^a
CKB3	32	2.67 ± 0.21 ^{de}	19.67 ± 1.21 ^b	0.47 ± 0.06 ^b	0.71 ± 0.13 ^b	1.40 ± 0.09 ^{ab}	56 ± 3 ^b
	64	2.60 ± 0.19 ^{de}	20.50 ± 2.00 ^b	0.48 ± 0.06 ^b	0.72 ± 0.22 ^b	1.38 ± 0.14 ^{ab}	45 ± 1 ^a
	96	3.40 ± 0.12 ^a	31.00 ± 0.00 ^d	0.40 ± 0.02 ^a	1.11 ± 0.08 ^d	1.46 ± 0.27 ^b	46 ± 2 ^{ad}
COR45a+KB3	32	3.11 ± 0.04 ^{ab}	25.50 ± 2.00 ^a	0.45 ± 0.12 ^b	0.94 ± 0.01 ^a	1.49 ± 0.01 ^b	61 ± 4 ^c
	64	3.22 ± 0.14 ^a	25.00 ± 1.00 ^a	0.43 ± 0.01 ^{ab}	0.89 ± 0.05 ^a	1.44 ± 0.03 ^{ab}	45 ± 1 ^a
	96	3.35 ± 0.11 ^a	31.00 ± 0.00 ^d	0.44 ± 0.02 ^{ab}	0.10 ± 0.04 ^a	1.41 ± 0.02 ^{ab}	46 ± 2 ^{ad}
L	32	2.51 ± 0.17 ^e	14.67 ± 1.16 ^e	0.65 ± 0.02 ^{cd}	0.55 ± 0.01 ^e	1.00 ± 0.07 ^d	39 ± 2 ^d
	64	2.15 ± 0.09 ^f	12.50 ± 0.70 ^f	0.71 ± 0.02 ^d	0.37 ± 0.05 ^f	0.95 ± 0.01 ^d	35 ± 3 ^{de}
	96	1.66 ± 0.23 ^g	10.50 ± 0.70 ^g	0.84 ± 0.09 ^d	0.19 ± 0.02 ^g	0.37 ± 0.01 ^e	32 ± 1 ^e
LOR45a	32	2.90 ± 0.07 ^{bc}	19.00 ± 0.58 ^b	0.44 ± 0.01 ^{ab}	0.77 ± 0.01 ^b	1.24 ± 0.04 ^c	37 ± 1 ^d
	64	2.81 ± 0.15 ^c	17.00 ± 1.00 ^b	0.54 ± 0.01 ^{bc}	0.65 ± 0.01 ^{bc}	1.22 ± 0.07 ^c	45 ± 1 ^a
	96	2.64 ± 0.25 ^{de}	21.00 ± 2.65 ^b	0.58 ± 0.02 ^c	0.59 ± 0.04 ^e	0.90 ± 0.12 ^d	48 ± 2 ^a
LKB3	32	2.97 ± 0.06 ^b	21.00 ± 1.00 ^b	0.45 ± 0.01 ^b	0.95 ± 0.01 ^a	1.50 ± 0.09 ^e	44 ± 4 ^{ad}
	64	2.95 ± 0.05 ^b	19.67 ± 0.58 ^b	0.54 ± 0.01 ^{bc}	0.73 ± 0.02 ^b	1.21 ± 0.03 ^c	43 ± 0 ^{ad}
	96	2.73 ± 0.61 ^d	22.67 ± 1.53 ^b	0.57 ± 0.10 ^c	0.61 ± 0.01 ^{bc}	0.93 ± 0.11 ^d	48 ± 4 ^a
LOR45a+KB3	32	2.84 ± 0.07 ^c	18.67 ± 0.58 ^{bh}	0.45 ± 0.01 ^b	0.71 ± 0.01 ^b	1.38 ± 0.10 ^a	44 ± 4 ^a
	64	2.77 ± 0.15 ^d	19.67 ± 1.56 ^b	0.48 ± 0.07 ^b	0.76 ± 0.04 ^b	1.34 ± 0.29 ^a	43 ± 0 ^{ad}
	96	2.94 ± 0.05 ^b	25.00 ± 2.00 ^a	0.56 ± 0.23 ^c	0.60 ± 0.03 ^{bc}	1.03 ± 0.05 ^c	52 ± 2 ^b

H'_{Eco} —Shannon–Weaver diversity index; S—metabolic richness index; G—Gini coefficient; A_{max} —maximum microbial activity; AWCD—average well color development; Avt_{50} —time at which the total microbial activity increased at the fastest rate. The values that are indicated by different lower case letters are statistically significant and referred to changes in all SBRs during the wastewater treatment.

Table S4. The values of carbon, nitrogen and phosphorus usage indices for the non-inoculated and bioaugmented AS, fed only with the synthetic wastewater and cotreated with the phenolic landfill leachate during 96 days.

Bioreactor	Time, Days	Usage of Biolog [®] EcoPlate substrates		
		C-USE	N-USE	P-USE
C	0	77.42 ± 0.00 ^a	31.50 ± 3.41 ^a	5.31 ± 0.41 ^a
	32	66.68 ± 1.87 ^b	35.61 ± 1.59 ^b	4.98 ± 0.06 ^b
	64	77.42 ± 0.00 ^a	31.05 ± 4.42 ^a	5.46 ± 0.31 ^a
	96	90.32 ± 0.00 ^c	32.36 ± 1.44 ^a	4.27 ± 0.28 ^{bc}
COR45a	32	67.74 ± 3.23 ^b	36.80 ± 1.50 ^b	2.43 ± 0.45 ^d
	64	66.13 ± 2.26 ^b	39.76 ± 0.89 ^c	2.15 ± 0.81 ^d
	96	90.32 ± 0.00 ^c	32.03 ± 0.55 ^a	1.09 ± 0.03 ^e
CKB3	32	63.45 ± 3.90 ^b	32.30 ± 0.54 ^a	1.10 ± 0.03 ^e
	64	66.13 ± 6.45 ^b	34.23 ± 0.97 ^b	1.66 ± 1.35 ^{de}
	96	100.00 ± 0.00 ^d	31.72 ± 0.80 ^a	4.18 ± 0.16 ^c
COR45a+KB3	32	82.26 ± 6.45 ^a	31.35 ± 1.48 ^a	3.18 ± 0.59 ^f
	64	80.65 ± 3.23 ^a	30.53 ± 1.99 ^a	3.75 ± 1.54 ^c
	96	100.00 ± 0.00 ^d	32.54 ± 1.13 ^a	4.08 ± 0.20 ^c
L	32	47.32 ± 3.74 ^e	32.85 ± 1.19 ^a	3.53 ± 0.25 ^c
	64	40.32 ± 2.26 ^f	36.13 ± 0.08 ^b	0.94 ± 0.38 ^e
	96	33.87 ± 2.29 ^g	41.50 ± 0.38 ^c	0.00 ± 0.00 ^g
LOR45a	32	61.29 ± 1.87 ^b	31.82 ± 2.27 ^a	2.00 ± 0.56 ^d
	64	54.84 ± 3.23 ^b	29.76 ± 0.69 ^d	2.03 ± 0.57 ^e
	96	67.74 ± 8.55 ^b	31.39 ± 4.46 ^a	3.18 ± 0.45 ^f
LKB3	32	67.74 ± 3.23 ^b	33.22 ± 0.83 ^{ab}	3.81 ± 0.42 ^c
	64	63.45 ± 1.87 ^b	35.09 ± 0.37 ^b	3.17 ± 0.07 ^f
	96	73.13 ± 4.94 ^b	31.26 ± 0.83 ^a	0.48 ± 0.09 ^h
LOR45a+KB3	32	60.23 ± 1.87 ^{bh}	35.52 ± 0.47 ^b	3.19 ± 0.58 ^f
	64	63.45 ± 5.03 ^b	33.95 ± 1.78 ^{ab}	2.31 ± 0.15 ^d
	96	80.65 ± 6.45 ^a	30.52 ± 0.41 ^a	0.43 ± 0.16 ^h

C-USE – carbon usage index, N-USE – nitrogen usage index, P-USE – phosphorus usage index. The values that are indicated by different lower case letters are statistically significant and referred to changes in all SBRs during wastewater treatment.

III. Podsumowanie

1. Wyniki testu hamowania wzrostu mikroorganizmów autochtonicznych osadu czynnego w obecności odcieków z osadów dennych stawu Kalina pozwoliły na wyznaczenie wartości EC_{50} i MIC_{100} , które odpowiadały udziałowi procentowemu odcieków w ściekach, wynoszącemu odpowiednio 6,69% i 11,26%.
2. Obecność odcieków w osadzie czynnym wywarła negatywny wpływ na parametry operacyjne procesu oczyszczania ścieków, w tym na efektywność usuwania zanieczyszczeń (ChZT) oraz przyczyniła się do obniżenia aktywności mikrobiologicznej, potencjału funkcjonalnego, liczebności mikroorganizmów heterotroficznych i różnorodności strukturalnej w tym środowisku.
3. Ocena potencjału degradacyjnego oraz cech funkcjonalnych dziesięciu wyselekcjonowanych szczepów bakterii pozwoliła na wyłonienie dwóch szczepów *P. putida* OR45a i *P. putida* KB3 jako potencjalnych kandydatów do bioaugmentacji osadu czynnego obciążonego odciekami.
4. Analiza genomów szczepów *P. putida* KB3 i *P. putida* OR45a umożliwiła identyfikację genów kodujących białka zaangażowane w szlaki rozkładu związków aromatycznych oraz warunkujących oporność bakterii na rozpuszczalniki organiczne i wysokie stężenie jonów chromu (Cr^{6+}).
5. Bioaugmentacja osadu czynnego obciążonego odciekami szczepami *P. putida* KB3 i *P. putida* OR45a oraz ich konsorcjum korespondowała ze wzrostem aktywności enzymatycznej, żywej biomasy i potencjału funkcjonalnego mikroorganizmów w tym środowisku.
6. Inokulacja osadu czynnego szczepami *P. putida* KB3 i *P. putida* OR45a oraz ich konsorcjum umożliwiła zachowanie wysokiej efektywności usuwania azotu amonowego oraz zanieczyszczeń organicznych, m.in. związków fenolowych, w mieszaninie ścieków i odcieków.
7. Inokulacja osadu czynnego szczepem *P. putida* KB3 stanowiła najbardziej efektywną strategię bioaugmentacji i korelowała ze znaczącym wzrostem aktywności enzymatycznej mikroorganizmów autochtonicznych, efektywności usuwania związków fenolowych, ChZT i azotu amonowego oraz powstawaniem ścieków oczyszczonych o wysokiej jakości.
8. Ze względu na wysoki potencjał bioaugmentacyjny, wprowadzenie szczepu *P. putida* KB3 do osadu może stanowić efektywne rozwiązanie problemów wielu oczyszczalni ścieków obciążonych zafenolowanymi odciekami ze składowisk odpadów.
9. Zastosowanie wieloczynnikowej analizy parametrów istotnych dla procesu oczyszczania ścieków w połączeniu z prostymi metodami biologicznymi (pomiar stężenia ATP, mikrobiologicznej aktywności metabolicznej, potencjału funkcjonalnego i specyficznego poziomu poboru tlenu) w miejsce przeprowadzania kosztownych analiz genetycznych, może być racjonalnym sposobem umożliwiającym wczesne ostrzeżenie o pogorszeniu się stanu osadu czynnego i funkcjonowaniu oczyszczalni ścieków.

IV. Streszczenie

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

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

Charakterystyka składu fizykochemicznego i mikrobiologicznego odcieków pochodzących z osadów dennych stawu Kalina wykazała, że były one wysoko obciążone ładunkiem zanieczyszczeń organicznych i obecne w nich były wskaźnikowe bakterie chorobotwórcze, co łącznie może stanowić potencjalne zagrożenie sanitarne i epidemiologiczne dla środowiska. Egzystujące w wodach odciekowych mikroorganizmy heterotroficzne charakteryzowały się niskim potencjałem funkcjonalnym i słabą aktywnością metaboliczną. Badania toksyczności ostrej odcieków pozwoliły na wyznaczenie wartości NIC, EC₅₀ i MIC₁₀₀, odpowiednio 3,45%, 6,69% i 11,26%.

Analiza wpływu długotrwałej obecności 3,5%, a następnie 5,5% odcieków w ściekach na parametry operacyjne procesu oczyszczania ścieków syntetycznych wykazała spadek efektywności usuwania ChZT w bioreaktorze typu SBR, któremu towarzyszył wzrost wartości pH w ściekach do 9,3. Ponadto zaobserwowano, że zmiany pH w bioreaktorze obciążonym odciekami były skorelowane z pogorszeniem się właściwości sedymentacyjnych osadu czynnego, o czym świadczyła niska wartość indeksu opadowego (IO), poniżej 70 cm³/g. Analizy mikroskopowe potwierdziły także zmiany morfologiczne kłaczków w osadzie czynnym obciążonym odciekami. Wyniki badań wskazały, że obecność odcieków w osadzie czynnym przyczyniła się do obniżenia stosunku MLVSS do MLSS, który był zbyt niski, aby możliwe było osiągnięcie efektywnego usunięcia zanieczyszczeń w ściekach. Ponadto zawartość zawiesin ogólnych w tym bioreaktorze poniżej 2,5 mg/l nie pozwalała na osiągnięcie pożądanego stężenia mikroorganizmów w osadzie czynnym. Wyniki badań dotyczących zmian różnorodności funkcjonalnej zespołów mikroorganizmów zasiedlających osad czynny obciążony odciekami w stężeniach 3,5% i 5,5% wskazały na utratę zdolności mikroorganizmów autochtonicznych osadu czynnego do metabolizowania odpowiednio 33% i 40% substratów na płytkach EcoPlate™. Mikroorganizmy autochtoniczne w tych osadach preferencyjnie metabolizowały przede wszystkim węglowodany i związki fenolowe. Porównując mikroorganizmy z bioreaktora kontrolnego oraz obciążonego wodami odciekowymi stwierdzono, że bakterie narażone na działanie odcieków odznaczały się większą zdolnością do utylizacji związków zawierających azot, lecz nie potrafiły metabolizować związków zawierających fosfor. Otrzymane wyniki wskazują, że wprowadzenie wód odciekowych do ścieków znacząco wpłynęło także na obniżenie aktywności dehydrogenaz i

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

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

Analiza genomów *P. putida* OR45a i *P. putida* KB3 potwierdziła ich zdolność do rozkładu jednopierścieniowych związków aromatycznych i produkcji egzopolisacharydu – alginianu. Ponadto u badanych mikroorganizmów stwierdzono obecność genów kodujących białka pośredniczące w obronie przed stresem oksydacyjnym. Zarówno szczep *P. putida* OR45a, jak i *P. putida* KB3 posiadały pompy efflux, zwiększające ich oporność na różne rozpuszczalniki, takie jak: *n*-heksan, *p*-ksylen, toluen, styren, *m*-ksylen, propylobenzen i etylobenzen. W genomach badanych bakterii wykazano dodatkowo obecność operonu *mer*, związanego z opornością komórek na jony Hg²⁺, a w genomie szczepu *P. putida* KB3 potwierdzono obecność genów kodujących białka odpowiedzialne za przeciwdziałanie stresowi oksydacyjnemu wywołanemu przez jony chromu. Oba szczepy posiadały także zdolność do wzrostu w obecności wysokich stężeń jonów amonowych, wynoszących odpowiednio 600 i 1000 µg/ml.

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

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

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

V. Summary

Cotreatment of the landfill leachate with municipal wastewater in the biological wastewater treatment plants is a very common practice in Poland. Due to the complex and diverse physicochemical composition, the leachate may be toxic for the activated sludge microorganisms and has a harmful effect on the wastewater treatment process. Bioaugmentation appears to be a beneficial solution for perturbations of many sewage plants associated with their exposure to the presence of high concentrations of the leachate in wastewater. This strategy involves the introduction of selected bacterial strains or microbial consortia into the activated sludge environment to enhance the degradative potential of autochthonous microorganisms and to improve the sludge condition. Beyond the high degradative potential, the candidate bacteria for bioaugmentation should possess the ability to produce compounds, which support the degradation of contaminants present in wastewater, i.e. siderophores, bioflocculants and biosurfactants. In addition, they should also be able to incorporate into the flocs structure and to coaggregate with the autochthonous microorganisms inhabiting this ecosystem.

The main purpose of this study was to assess the effluent treatment efficiency after bioaugmentation of the activated sludge spiked with the landfill leachate from the bottom sediments of the Kalina pond in Świętochłowice with *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 strains, as well as their consortium. Moreover, the impact of introduced bacteria on the activated sludge condition, enzymatic activity, content of live biomass and the functional potential of the autochthonous microbial communities present in this environment was evaluated.

The characteristics of the physicochemical and microbiological composition of the leachate from the bottom sediments of the Kalina pond showed that it was characterized by the high pollution load and the presence of indicator pathogenic bacteria, therefore, it may pose a potential sanitary and epidemiological threat to the environment. Heterotrophic microorganisms that were present in the landfill leachate were characterized by the low functional potential and poor metabolic activity. The studies determining the acute toxicity of the landfill leachate allowed to determine the NIC, EC₅₀ and MIC₁₀₀ values of 3.45%, 6.69% and 11.26%, respectively.

The analysis of the impact of long-term presence of 3.5% and then 5.5% of the leachate in wastewater on the operational parameters of the synthetic wastewater treatment process showed a decrease in the COD removal efficiency in the SBR, which was accompanied by an increase in wastewater pH to 9.3. In addition, it was observed that the pH changes in the leachate-laden bioreactor were correlated with the deterioration of the activated sludge settling properties, as evidenced by the low value of its volume index (SVI) below 70 cm³/g. Microscopic analyzes also confirmed the changes in morphology of the flocs in the activated sludge loaded with the leachate. The results indicated that the presence of the landfill leachate in the activated sludge contributed to a decrease in the MLVSS to MLSS ratio, which was too low to achieve effective removal of pollutants in wastewater. In addition, the content of the MLSS in this system below 2.5 mg/l did not allow to achieve the desired concentration of microorganisms in the activated sludge. The results of research on changes in the functional diversity of microbial communities present in the activated sludge loaded with leachate at the concentrations of 3.5% and 5.5% indicated a loss of the ability of the autochthonous microorganisms to metabolize 33% and 40% of substrates on EcoPlateTM plates, respectively. The autochthonous microorganisms present in this system preferentially metabolized carbohydrates and phenolic compounds available on the EcoPlateTM. Comparing microorganisms from the control bioreactor and this spiked with the leachate, it was found that bacteria exposed to the leachate had higher ability to utilize nitrogen-containing compounds, but they were unable to metabolize phosphorus-containing compounds. The obtained results indicated that the introduction of the leachate to wastewater significantly reduced the activity of dehydrogenases and non-specific esterases in the activated sludge, which was also correlated with a decrease in the metabolic activity in this ecosystem. Low metabolic activity in leachate-laden activated sludge corresponded with a loss of the ability of autochthonous microorganisms to utilize specific

growth substrates, including compounds containing phosphorus and with an increase in the use of phenolic and nitrogen-containing compounds. Analysis of the fatty acid profiles (FAMES) showed that the activated sludge autochthonous microorganisms were very sensitive to the contaminants present in the leachate and exhibited adaptive mechanisms to the presence of the leachate in the synthetic wastewater. The major changes in FAMES profiles concerned the increase in the content of the saturated fatty acids, mainly branched and cyclopropane fatty acids. In response to pH stress resulting from the presence of the leachate in wastewater, an increase in the yield of the *anteiso/iso*-branched fatty acids in the FAME patterns was also observed. The differences in the yield of the individual fatty acids in the FAME profiles of the analyzed activated sludge samples were associated with variations in the structure of microbial communities in this environment. At the end of the experiment, in FAME profiles of the control and leachate-laden activated sludge dominated marker fatty acids for Gram-negative bacteria. Contrary to the control sludge, an additional decrease in the percentage of marker fatty acids for Protozoa and an increase in the percentage of FAMES markers for Gram-positive bacteria and fungi was observed in the FAMES profiles obtained for leachate-laden system.

As a result of detailed characterization of ten bacterial strains, two of them *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 were selected for bioaugmentation studies. Selected microorganisms were able to grow in the presence of high concentration of catechol, benzoate, 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, phenol, 2-methylphenol, 4-methylphenol and mixture of cresols. In addition, their ability to produce siderophores, which support the action of enzymes involved in the degradation of aromatic compounds, was confirmed. The results revealed that *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 strains were able to coaggregate with the activated sludge autochthonous microorganisms and were characterized by a strong bioflocculation ability (50% to 70%). The analyzes also confirmed the ability of *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3 to synthesize exopolysaccharide and N-AHLs. In addition, based on their adhesion to *p*-xylene, both strains exhibited strong hydrophobic properties (CSH > 50%). However, it is worth emphasizing, that only in *P. putida* OR45a the presence of leachate led to a modification of the cell surface towards a more hydrophobic nature than in *P. putida* KB3, which may suggest that this bacterium was able to degrade contaminants present in the leachate. Preliminary assessment of the ability of both strains to produce biosurfactants indicated their potential ability to produce surface active compounds. In turn, the analysis of both strains in terms of their ability to emulsify hydrocarbons present in diesel oil confirmed that they produced compounds with high emulsifying activity (> 45%).

Genomic analysis of both bacteria confirmed their ability to degrade monocyclic aromatic compounds and produce exopolysaccharide - alginate. Moreover, genes encoding proteins involving in microbial defense against oxidative stress were present in genomes of studied microorganisms. Both bacterial strains possess efflux pumps, which increase their resistance to various solvents, i.e. *n*-hexane, *p*-xylene, toluene, styrene, *m*-xylene, propylbenzene and ethylbenzene. The presence of the *mer* operon that confers a resistance of bacterial cells to Hg²⁺ ions was also confirmed in the genomes of studied bacteria. Moreover, the genes encoding proteins required to cope with the oxidative stress induced by chromium ions were found in the genome of *P. putida* KB3 strain. The obtained results indicated that tested bacterial strains had also the ability to grow in the presence of high concentrations of ammonium ions of 600 and 1000 µg/ml, respectively.

The last stage of the work was to evaluate the effectiveness of the wastewater treatment process after bioaugmentation of activated sludge loaded with leachate with selected strains of *P. putida* OR45a and *P. putida* KB3, and their consortium. At the end of the experiment, statistically significant decrease ($p < 0.05$) in the content of the phenolic compounds was found in all bioaugmented reactors. The largest reduction in the concentration of these compounds (95%) was recorded in the activated sludge bioaugmented with *P. putida* KB3 strain, while in the non-bioaugmented sludge autochthonous microorganisms were able to utilize only 50% of phenolic compounds present in the leachate. High efficiency of phenolic compounds removal in the systems inoculated with *P. putida* OR45a and *P. putida*

KB3 strains and their consortium corresponded with the high removal efficiency of organic contaminants and ammonium nitrogen. Also, bioaugmentation with the use of selected strains made possible to maintain the stability of the wastewater treatment process, which may indicate that there were no antagonistic interactions between the bacterial strains introduced into the bioreactor, as well as between these bacteria and indigenous microorganisms. In this stage of research, assessment of the impact of bioaugmentation on condition, enzymatic and metabolic activity as well as functional potential of activated sludge loaded with the leachate was also conducted. It was found that the presence of the leachate in wastewater contributed to a 53% reduction in the SOUR in the activated sludge. By comparison, this parameter reached almost 2-3 times higher values in the bioreactors loaded with the leachate and bioaugmented with selected bacterial strains, as well as in the control bioreactor, purifying only synthetic sewage. It was also found that the presence of the leachate in the wastewater had the greatest impact on the activity of dehydrogenases, esterases and catalases in the non-bioaugmented bioreactor, contributing to a significant reduction in their activity, which was 3-4 times higher in the control bioreactor and in the bioaugmented bioreactors. The increase in microbial activity in the bioaugmented activated sludge loaded with the leachate was correlated with the increase in sludge biomass, as well as the number of heterotrophic microorganisms, while in the non-bioaugmented reactor these parameters decreased significantly. It was found that microorganisms in the leachate-laden reactors were less metabolically active than bacteria in the control bioreactor and bioaugmented reactors. The presence of the leachate in sewage was a strong stress factor for microorganisms in the activated sludge. The leachate-laden bioreactor was not working properly as evidenced by the high SBI (>50%). The introduction of selected bacterial strains into the activated sludge mitigated the toxic effects of the substances present in the leachate, and thus contributed to the reduction of stress level in this environment (SBI <40%) and allowed to maintain high metabolic activity. The analysis of the metabolic profiles of microorganisms in the leachate-laden activated sludge showed that metabolic specialization of bacteria took place to a lesser extent in the systems inoculated with selected bacterial strains. A significant increase in the capability of indigenous microorganisms in the activated sludge bioaugmented with tested strains to metabolize phenolic compounds may indicate the ability of these bacteria to survive and proliferate in this environment.

Analysis of the operational parameters and indicators of the activated sludge condition and functional potential of indigenous microorganisms showed a strong correlation between the application of bioaugmentation strategy in the bioreactors loaded with the leachate from the Kalina pond and high microbiological activity and efficiency of the wastewater treatment process. Inoculation of the activated sludge with *P. putida* KB3 strain proved to be the most effective solution among the bioaugmentation strategies that have been used. Due to the high bioaugmentation potential, introduction of *P. putida* KB3 strain into activated sludge can be an effective solution to the problems of many wastewater treatment plants loaded with phenolic landfill leachate.

VI. Oświadczenia doktoranta i współautorów

mgr Justyna Michalska
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Śląski w Katowicach

Oświadczenie

Oświadczam, że w niżej wymienionych pracach mój udział obejmował:

1. **Michalska J.**, Greń I., Mroziak A. 2018. Cele, strategie i ocena efektywności bioaugmentacji osadu czynnego zdefiniowanymi mikroorganizmami w usuwaniu toksycznych związków chemicznych. *Postępy Mikrobiologii*, 57(2): 125-137

- opracowanie koncepcji manuskryptu
- zebranie i przeanalizowanie danych literaturowych
- opracowanie i przygotowanie rysunków do manuskryptu
- przygotowanie manuskryptu

2. **Michalska J.**, Mroziak A. 2018. Zastosowanie bioaugmentacji w procesach biologicznego oczyszczania ścieków i utylizacji osadów. *Ochrona Środowiska*, 40(1): 35-44

- opracowanie koncepcji manuskryptu
- zebranie i przeanalizowanie danych literaturowych
- opracowanie i przygotowanie rysunków do manuskryptu
- przygotowanie manuskryptu

3. **Michalska J.**, Greń I., Żur J., Wasilkowski D., Mroziak A. 2019. Biological cotreatment of the Kalina Pond leachate on laboratory sequencing batch reactor operation and activated sludge quality. *Water*, 11(8): 1-24

- współudział w opracowaniu koncepcji badań
- pobranie prób odcieków i osadu czynnego do badań
- charakterystykę składu fizykochemicznego i mikrobiologicznego odcieków
- ocenę potencjału funkcjonalnego mikroorganizmów heterotroficznych występujących w odciekach
- analizę wpływu odcieków na parametry operacyjne procesu oczyszczania ścieków oraz mikroorganizmy autochtoniczne osadu czynnego
- współudział w ekstrakcji i identyfikacji FAMES
- analizę statystyczną i wizualizację uzyskanych wyników
- zebranie i szczegółowe przeanalizowanie danych literaturowych
- udział w przygotowaniu manuskryptu

4. **Michalska J.**, Piński A., Żur J., Mroziak A. 2020a. Selecting bacterial candidates for the bioaugmentation of activated sludge to improve the aerobic treatment of landfill leachate. *Water*, 12(1): 1-26

- współudział w opracowaniu koncepcji badań
- pobranie prób odcieków i osadu czynnego do badań
- współudział w identyfikacji gatunkowej szczepów: *Pseudomonas putida* KB3, *Pseudomonas putida* OR45a, *Glutamicibacter soli* OR45b i *Rhodococcus erythropolis* KB4
- ocenę potencjału degradacyjnego badanych szczepów bakteryjnych w kierunku rozkładu wybranych związków fenolowych, hydrofobowości powierzchni ich komórek oraz zdolności tych bakterii do wzrostu w obecności odcieków i wybranych jonów, produkcji biosurfaktantów, sideroforów i cząsteczek sygnałowych laktonu N-acylo-L-homoseryny, a także chemotaksji
- analizę statystyczną i wizualizację uzyskanych wyników
- zebranie i szczegółowe przeanalizowanie danych literaturowych
- udział w przygotowaniu manuskryptu

5. **Michalska J.**, Żur J., Piński A., Mroziak A. 2020b. Analysis of the bioaugmentation potential of *Pseudomonas putida* OR45a and *Pseudomonas putida* KB3 in the sequencing batch reactors fed with the phenolic landfill leachate. *Water*, 12(3): 1-21

- współudział w opracowaniu koncepcji badań
- pobranie prób odcieków i osadu czynnego do badań
- przygotowanie zawiesiny szczepów *Pseudomonas putida* KB3 i *Pseudomonas putida* OR45a
- przeprowadzenie doświadczenia bioaugmentacyjnego
- oznaczenie zawartości związków fenolowych w ściekach przed, w trakcie i po zakończeniu prowadzenia badań
- określenie wpływu wprowadzonych od osadu czynnego szczepów bakteryjnych na efektywność usuwania azotu amonowego oraz zanieczyszczeń organicznych, m.in. związków fenolowych, w mieszaninie ścieków i odcieków oraz aktywność enzymatyczną, żywą biomasę, liczebność bakterii heterotroficznych i potencjał funkcjonalny zespołów mikroorganizmów w osadzie
- analizę statystyczną i wizualizację uzyskanych wyników
- zebranie i szczegółowe przeanalizowanie danych literaturowych
- udział w przygotowaniu manuskryptu.

Katowice, 04.05.2020r.....

.....
Justyna Michalska
mgr Justyna Michalska

prof. dr hab. Agnieszka Mrozik
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Śląski w Katowicach

Oświadczenie

W związku z wykorzystaniem przez Panią magister Justynę Michalską poniżej wymienionych publikacji jako rozprawy doktorskiej oświadczam, że mój udział, jako promotora, polegał na udziale w opracowaniu koncepcji badań, analizie wyników i przygotowaniu manuskryptów. Jednocześnie uznaje, że wkład Pani mgr Justyny Michalskiej w przygotowanie publikacji był wiodący. Przeprowadzone przez Panią mgr Justynę Michalską badania, analiza statystyczna i graficzne opracowanie wyników były kluczowe dla powstania tych prac. Oświadczam, że mój udział procentowy w poniższych publikacjach wynosił:

1. Michalska J., Greń I., Mrozik A. 2018. Cele, strategie i ocena efektywności bioaugmentacji osadu czynnego zdefiniowanymi mikroorganizmami w usuwaniu toksycznych związków chemicznych. *Postępy Mikrobiologii*, 57(2): 125-137

- 15% i obejmował współudział w opracowaniu koncepcji i napisaniu manuskryptu.

2. Michalska J., Mrozik A. 2018. Zastosowanie bioaugmentacji w procesach biologicznego oczyszczania ścieków i utylizacji osadów. *Ochrona Środowiska*, 40(1): 35-44

- 25% i obejmował współudział w opracowaniu koncepcji i napisaniu manuskryptu.

3. Michalska J., Greń I., Żur J., Wasilkowski D., Mrozik A. 2019. Biological cotreatment of the Kalina Pond leachate on laboratory sequencing batch reactor operation and activated sludge quality. *Water*, 11(8): 1-24

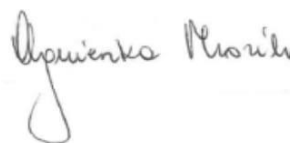
- 10% i obejmował współudział w projektowaniu doświadczeń, analizie wyników i opracowaniu manuskryptu.

4. Michalska J., Piński A., Żur J., Mrozik A. 2020a. Selecting bacterial candidates for the bioaugmentation of activated sludge to improve the aerobic treatment of landfill leachate. *Water*, 12(1): 1-26

- 15% i obejmował współudział w projektowaniu doświadczeń, analizie wyników i opracowaniu manuskryptu.

5. Michalska J., Żur J., Piński A., Mrozik A. 2020b. Analysis of the bioaugmentation potential of *Pseudomonas putida* OR45a and *Pseudomonas putida* KB3 in the sequencing batch reactors fed with the phenolic landfill leachate. *Water*, 12(3): 1-21

- 15% i obejmował współudział w projektowaniu doświadczeń, analizie wyników i opracowaniu manuskryptu.



Katowice, 04.05.2020 r.

prof. dr hab. Agnieszka Mrozik

dr Izabela Greń
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Śląski w Katowicach

Oświadczenie

W związku z wykorzystaniem przez Panią magister Justynę Michalską poniżej wymienionych publikacji jako rozprawy doktorskiej oświadczam, że mój udział procentowy, jako współautora, wynosił:

1. Michalska J., Greń I., Mroziak A. 2018. Cele, strategie i ocena efektywności bioaugmentacji osadu czynnego zdefiniowanymi mikroorganizmami w usuwaniu toksycznych związków chemicznych. Postępy Mikrobiologii, 57(2): 125-137

- 10% i obejmował współudział w napisaniu rozdziałów: „Pojedyncze szczepy grzybów mikroskopowych” i „Mikroorganizmy modyfikowane genetycznie”.

2. Michalska J., Greń I., Żur J., Wasilkowski D., Mroziak A. 2019. Biological cotreatment of the Kalina pond leachate on laboratory sequencing batch reactor operation and activated sludge quality. Water, 11(8): 1-24

- 5% i obejmował współudział w projektowaniu doświadczeń.

Katowice, 04.05.2020


.....
dr Izabela Greń

dr Joanna Żur
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Śląski w Katowicach

Oświadczenie

W związku z wykorzystaniem przez Panią magister Justynę Michalską poniżej wymienionych publikacji jako rozprawy doktorskiej oświadczam, że mój udział procentowy, jako współautora, wynosił:

1. Michalska J., Greń I., Żur J., Wasilkowski D., Mroziak A. 2019. Biological cotreatment of the Kalina pond leachate on laboratory sequencing batch reactor operation and activated sludge quality. *Water*, 11(8): 1-24

- 5% i obejmował współudział w analizie wyników.

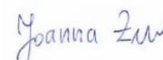
2. Michalska J., Piński A., Żur J., Mroziak A. 2020a. Selecting bacterial candidates for the bioaugmentation of activated sludge to improve the aerobic treatment of landfill leachate. *Water*, 12(1): 1-26

- 10% i obejmował współudział w analizie wyników i opracowaniu manuskryptu.

3. Michalska J., Żur J., Piński A., Mroziak A. 2020b. Analysis of the bioaugmentation potential of *Pseudomonas putida* OR45a and *Pseudomonas putida* KB3 in the sequencing batch reactors fed with the phenolic landfill leachate. *Water*, 12(3): 1-21

- 10% i obejmował współudział w analizie wyników i opracowaniu manuskryptu.

Katowice, ...03.05.2020.....



.....
dr Joanna Żur

dr Daniel Wasilkowski
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Śląski w Katowicach

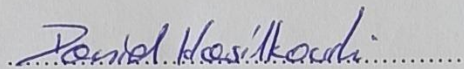
Oświadczenie

W związku z wykorzystaniem przez Panią magister Justynę Michalską poniżej wymienionych publikacji jako rozprawy doktorskiej oświadczam, że mój udział procentowy, jako współautora, wynosił:

1. Michalska J., Greń I., Żur J., Wasilkowski D., Mroziak A. 2019. Biological cotreatment of the Kalina pond leachate on laboratory sequencing batch reactor operation and activated sludge quality. *Water*, 11(8): 1-24

- 5% i obejmował współudział w ekstrakcji i identyfikacji FAMES.

Katowice, 04.05.2020r.


dr Daniel Wasilkowski

mgr Artur Piński
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Śląski w Katowicach

Oświadczenie

W związku z wykorzystaniem przez Panią magister Justynę Michalską poniżej wymienionych publikacji jako rozprawy doktorskiej oświadczam, że mój udział procentowy, jako współautora, wynosił:

1. Michalska J., Piński A., Żur J., Mroziak A. 2020a. Selecting bacterial candidates for the bioaugmentation of activated sludge to improve the aerobic treatment of landfill leachate. *Water*, 12(1): 1-26

- 10% i obejmował współudział w analizie genomów szczepów *Pseudomonas putida* OR45a i *Pseudomonas putida* KB3 oraz analizie statystycznej uzyskanych wyników.

3. Michalska J., Żur J., Piński A., Mroziak A. 2020b. Analysis of the bioaugmentation potential of *Pseudomonas putida* OR45a and *Pseudomonas putida* KB3 in the sequencing batch reactors fed with the phenolic landfill leachate. *Water*, 12(3): 1-21

- 10% i obejmował współudział w analizie statystycznej uzyskanych wyników.

Katowice,...03.05.2020.....

.....
mgr Artur Piński