

Rozszerzone streszczenie

Tytuł pracy doktorskiej:

Degradacja naturalnych i antropogenicznych zanieczyszczeń w wodach powierzchniowych w aspekcie zjawiska samooczyszczania

Doktorant: Bhautik Dave

Promotor: dr hab. inż. Ewa Łobos-Moysa, prof. PS

1. Wprowadzenie

Systemy wód powierzchniowych są kluczowe dla stabilności ekologicznej, zdrowia człowieka oraz rozwoju społeczno-gospodarczego, jednak coraz częściej są obciążone ciągłym dopływem chemicznie zróżnicowanych zanieczyszczeń. Dynamiczny wzrost populacji, urbanizacja, rozwój przemysłu oraz zmieniające się wzorce konsumpcji znacząco zwiększyły emisję organicznych mikrozanieczyszczeń do rzek, jezior i zbiorników wodnych. Wiele z tych związków, określanych jako zanieczyszczenia nowo pojawiające się (emerging contaminants), pochodzi z farmaceutyków, produktów higieny osobistej, substancji związanych ze stylem życia oraz zastosowań przemysłowych. Chociaż zwykle występują w niskich stężeniach, ich aktywność biologiczna, trwałość oraz ciągłe wprowadzanie do środowiska umożliwiają długotrwałą ekspozycję i oddziaływanie ekologiczne w środowisku wodnym [1–4].

Jednym z głównych wyzwań związanych z zanieczyszczeniami nowo pojawiającymi się jest ich niepełne usuwanie w procesach naturalnej atenuacji oraz w konwencjonalnych technologiach uzdatniania wody. Wody powierzchniowe posiadają naturalną zdolność do samooczyszczania poprzez rozcieńczanie, fotodegradację, sorpcję, pobieranie przez rośliny oraz aktywność mikroorganizmów, jednak w obecnych warunkach środowiskowych zdolność ta jest często przekraczana. Spośród tych procesów biodegradacja mikrobiologiczna stanowi główny biologiczny mechanizm transformacji zanieczyszczeń organicznych i w sprzyjających warunkach może prowadzić do ich znaczącej degradacji. W naturalnych środowiskach wodnych proces mikrobiologicznego samooczyszczania ma jednak charakter pasywny i cechuje się dużą zmiennością, wynikającą z efektów rozcieńczania, ograniczonej dostępności składników odżywczych, konkurencji ekologicznej oraz zmiennych warunków fizykochemicznych. W rezultacie wiele biologicznie aktywnych związków utrzymuje się w wodach powierzchniowych pomimo ich potencjalnej biodegradowalności w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych [5–8].

Zanieczyszczenia nowo pojawiające się obejmują zarówno związki naturalnego pochodzenia, jak i substancje antropogeniczne, które znacznie różnią się właściwościami fizykochemicznymi, zachowaniem w środowisku oraz podatnością na degradację mikrobiologiczną. Do naturalnie występujących zanieczyszczeń należą m.in. kofeina i nikotyna, które są stale wprowadzane do środowiska wodnego poprzez ścieki komunalne, spływy miejskie oraz działalność rolniczą. Pomimo biologicznego pochodzenia ich trwała obecność w środowisku wynika z ciągłego dopływu oraz niepełnej eliminacji. Z kolei zanieczyszczenia antropogeniczne, takie jak metyloparaben czy triklokarbanilid, są syntetycznymi związkami zaprojektowanymi w celu uzyskania wysokiej stabilności chemicznej i właściwości przeciwdrobnoustrojowych, co znacząco utrudnia ich biodegradację w środowisku wodnym. Różnice te podkreślają znaczenie oceny usuwania zanieczyszczeń w

szerokim spektrum związków o zróżnicowanej złożoności molekularnej i podatności na biodegradację przy analizie procesów mikrobiologicznego samooczyszczania [9–13]. Stężenia zanieczyszczeń analizowane w niniejszym badaniu zostały celowo przyjęte na poziomie wyższym niż typowo raportowane w wodach powierzchniowych. Taki dobór warunków umożliwił ocenę tolerancji mikroorganizmów, ich zdolności adaptacyjnych oraz potencjału degradacyjnego w warunkach konserwatywnego obciążenia, istotnych z punktu widzenia systemów oczyszczania oraz sytuacji nagłego dopływu zanieczyszczeń. Odniesienie do warunków środowiskowych zapewniono poprzez zastosowanie matryc składników odżywczych opartych na ściekach oraz integrację systemową, a nie poprzez odwzorowanie bezwzględnych stężeń środowiskowych [14,15].

Aktywność mikroorganizmów odgrywa kluczową rolę w kształtowaniu losów środowiskowych związków organicznych, przy czym bakterie i grzyby stanowią komplementarne systemy biologiczne odpowiedzialne za degradację zanieczyszczeń. Degradacja bakteryjna jest zwykle związana z wewnątrzkomórkowymi szlakami enzymatycznymi umożliwiającymi transformację związków o niskiej masie cząsteczkowej i wysokiej rozpuszczalności w wodzie, natomiast grzyby, zwłaszcza gatunki białej zgnilizny, wykorzystują zewnątrzkomórkowe enzymy oksydacyjne zdolne do transformacji związków o bardziej złożonej strukturze lub charakterze hydrofobowym. Choć oba systemy wykazują znaczący potencjał degradacyjny w warunkach laboratoryjnych, ich skuteczność w rzeczywistych matrycach wodnych pozostaje ograniczona. Jednoorganizmowe systemy mikrobiologiczne często charakteryzują się obniżoną stabilnością i efektywnością w obecności mieszanin zanieczyszczeń, w warunkach ubogich w składniki odżywcze oraz przy zmiennych warunkach środowiskowych, szczególnie podczas skalowania procesów poza warunki laboratoryjne [16–19].

Sztuczne mokradła stanowią inżynierskie rozszerzenie naturalnych procesów samooczyszczania i są obiecującą ekologiczną platformą do intensyfikacji biologicznie napędzanej degradacji zanieczyszczeń. Poprzez integrację porowatych podłoży, roślinności oraz biofilmowych społeczności mikroorganizmów systemy te tworzą uporządkowane środowisko sprzyjające aktywności mikrobiologicznej, wydłużające czas kontaktu między zanieczyszczeniami a organizmami degradującymi oraz stabilizujące warunki fizykochemiczne. Jednak większość istniejących systemów mokradłowych opiera się na naturalnie kolonizowanych, funkcjonalnie niezdefiniowanych społecznościach mikroorganizmów, co prowadzi do zmiennej skuteczności oczyszczania oraz ograniczonej kontroli nad degradacją mikrozanieczyszczeń. W konsekwencji sztuczne mokradła są często skuteczne w poprawie ogólnych parametrów jakości wody, lecz mniej niezawodne w ukierunkowanym usuwaniu trwałych zanieczyszczeń nowo pojawiających się [20–22].

Jednym z kluczowych wyzwań w rozwoju biologicznych technologii oczyszczania wody jest wypełnienie luki między laboratoryjnymi badaniami degradacji mikrobiologicznej a systemami oczyszczania funkcjonującymi w rzeczywistych warunkach środowiskowych. Eksperymenty laboratoryjne są zazwyczaj prowadzone w pożywkach bogatych w składniki odżywcze i w ściśle kontrolowanych warunkach, które nie odzwierciedlają złożoności rzeczywistych matryc wodnych, podczas gdy otwarte systemy wodne nie pozwalają na kontrolowaną ocenę procesów mikrobiologicznych. Ponadto mikroorganizmy przystosowane do warunków laboratoryjnych często nie są w stanie utrzymać wzrostu oraz wydajności degradacyjnej w środowiskach ściekowych o ograniczonej dostępności składników odżywczych, co ogranicza ich praktyczne zastosowanie [18,23,24].

W tym kontekście niniejsze badanie rozwija koncepcję inżynierskiego podejścia do mikrobiologicznego samooczyszczania, którego celem jest celowe wzmocnienie biologicznie kontrolowanych procesów degradacji ponad poziom pasywnej naturalnej atenuacji. Wyspecjalizowane mikroorganizmy bakteryjne i grzybowe zdolne do degradacji zanieczyszczeń są adaptowane do wzrostu w warunkach opartych na matrycach ściekowych, co umożliwia degradację zanieczyszczeń przy wykorzystaniu naturalnej zawartości składników odżywczych w syntetycznych ściekach jako jedyne źródła wzrostu. Tak przystosowane układy mikrobiologiczne są systematycznie oceniane w coraz bardziej złożonych warunkach, od eksperymentów biodegradacyjnych w skali laboratoryjnej po integrację w systemach sztucznych mokradł. Poprzez połączenie kontrolowanej adaptacji mikroorganizmów z inżynierskimi systemami ekologicznymi niniejsza praca przesuwa paradygmat samooczyszczania z niekontrolowanych procesów naturalnych w kierunku celowo projektowanych, biologicznie napędzanych strategii umożliwiających zwiększone, systemowe usuwanie zanieczyszczeń nowo pojawiających się z matryc wód powierzchniowych.

2. Metodyka

Metodyka zastosowana w niniejszym badaniu została zaprojektowana jako etapowy system eksperymentalny, obejmujący przejście od kontrolowanych eksperymentów biodegradacji mikrobiologicznej w skali laboratoryjnej do biomimetycznego systemu sztucznego mokradła w skali pilotażowej. Takie podejście umożliwiło systematyczną ocenę adaptacji mikroorganizmów, efektywności degradacji oraz stabilności systemu wraz ze wzrostem złożoności ekologicznej, przy jednoczesnym zachowaniu kontroli eksperymentalnej.

Wybrano cztery reprezentatywne zanieczyszczenia nowo pojawiające się, aby odzwierciedlić zarówno naturalne, jak i antropogeniczne klasy zanieczyszczeń powszechnie wykrywanych w wodach powierzchniowych. Kofeina i nikotyna zostały wybrane jako zanieczyszczenia pochodzenia naturalnego ze względu na ich powszechne występowanie, ciągłe wprowadzanie do środowiska oraz częściową biodegradowalność w środowisku wodnym. Związki te pochodzą głównie z konsumpcji związanej ze stylem życia oraz działalności rolniczej i reprezentują strukturalnie odmienne alkaloidy o wysokiej mobilności środowiskowej. Z kolei metyloparaben (MeP) oraz triklokarbanilid (TCC) wybrano jako reprezentatywne zanieczyszczenia antropogeniczne. Są to syntetyczne związki szeroko stosowane jako środki przeciwdrobnoustrojowe, charakteryzujące się zwiększoną stabilnością chemiczną i często wykazywane w wodach powierzchniowych pod wpływem ścieków z powodu ich niepełnego usuwania w konwencjonalnych procesach oczyszczania.

Wybrane zanieczyszczenia obejmują szeroki zakres właściwości fizykochemicznych, w tym masę cząsteczkową, polarność, rozpuszczalność oraz hydrofobowość. Ta różnorodność została celowo wykorzystana do oceny różnic w dostępności mikrobiologicznej, szlakach degradacji oraz skuteczności procesów oczyszczania dla różnych klas zanieczyszczeń. Związki pochodzenia naturalnego badano z wykorzystaniem systemów grzybowych, co wynika z ich podatności na zewnątrzkomórkowe mechanizmy oksydacyjne. Natomiast związki antropogeniczne analizowano przy użyciu systemów bakteryjnych o udokumentowanej zdolności do transformacji syntetycznych konserwantów i związków przeciwdrobnoustrojowych. Takie podejście stanowiło funkcjonalną podstawę oceny biologicznie napędzanych procesów samooczyszczania w warunkach kontrolowanych, a jednocześnie środowiskowo istotnych [25–27].

Aby zapewnić powtarzalność i wiarygodność analityczną, kofeinę i nikotynę ekstrahowano z naturalnych źródeł w celu zachowania zgodności z rzeczywistą matrycą środowiskową, natomiast MeP i TCC wprowadzano jako standardy analityczne o wysokiej czystości. Stężenia zanieczyszczeń stosowane zarówno w eksperymentach laboratoryjnych, jak i w systemie mokradła zostały celowo przyjęte na poziomie wyższym niż typowe stężenia w zanieczyszczonych środowiskach naturalnych. Pozwoliło to na wiarygodną ocenę tolerancji mikroorganizmów, ich zdolności adaptacyjnych oraz potencjału degradacyjnego w warunkach stresowych, istotnych dla sytuacji nagłego dopływu zanieczyszczeń i zastosowań inżynierskich, przy czym odniesienie do warunków środowiskowych zapewniono poprzez projekt systemu, a nie poprzez odwzorowanie rzeczywistych stężeń [28,29].

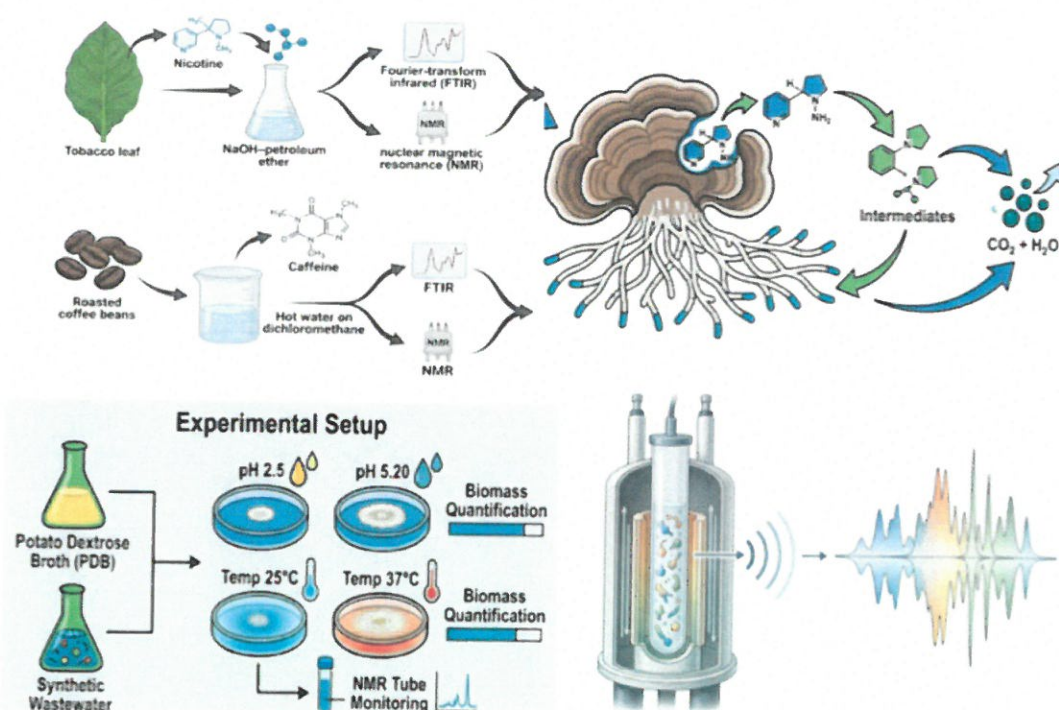
2.1 Systemy biodegradacji mikrobiologicznej w skali laboratoryjnej

Eksperymenty laboratoryjne zaprojektowano w celu oceny adaptacji mikroorganizmów, ich zachowania wzrostowego oraz efektywności biodegradacji w kontrolowanych warunkach wodnych. Dla systemów grzybowych i bakteryjnych zastosowano odmienne strategie eksperymentalne, co wynikało z fundamentalnych różnic w fizjologii mikroorganizmów, wymaganiach wzrostowych oraz mechanizmach degradacji.

2.1.1 Systemy grzybowe dla zanieczyszczeń naturalnych

Grzyb białej zgnilizny *Trametes versicolor* został wybrany jako organizm modelowy do biodegradacji kofeiny i nikotyny ze względu na dobrze udokumentowany zewnątrzkomórkowy system enzymatyczny oraz zdolność do transformacji strukturalnie zróżnicowanych związków organicznych. Przed rozpoczęciem eksperymentów biodegradacyjnych przeprowadzono badania adaptacji i możliwości wzrostu grzyba w celu potwierdzenia jego żywotności w warunkach wodnych zawierających zanieczyszczenia oraz ograniczoną dostępność składników odżywczych. Było to kluczowe, ponieważ wzrost grzybów strzępkowych w środowisku ciekłym nie może być zakładany w warunkach stresu środowiskowego [25,30–32].

Eksperymenty biodegradacji grzybowej prowadzono następnie w systemach okresowych (batch) z wykorzystaniem różnych mediów wodnych reprezentujących rosnący poziom złożoności środowiskowej. Pożywka bogata w składniki odżywcze stanowiła warunek referencyjny, natomiast syntetyczne ścieki wykorzystano jako matrycę ubogą w składniki odżywcze, reprezentującą zanieczyszczone wody powierzchniowe. Dodatkowo zastosowano media oparte na ekstraktach naturalnych w celu zachowania złożoności matrycy charakterystycznej dla rzeczywistych źródeł zanieczyszczeń. Eksperymenty prowadzono w statycznych warunkach tlenowych, aby uniknąć mechanicznego uszkodzenia grzybni oraz lepiej odzwierciedlić warunki występujące w pasywnych systemach oczyszczania (Rysunek 1).



Rysunek 1. Graficzna reprezentacja ekstrakcji kofeiny i nikotyny, degradacji grzybowej oraz eksperymentów analitycznych.

Parametry środowiskowe, takie jak temperatura i pH, były systematycznie zmieniane w celu oceny ich wpływu na wydajność degradacji grzybowej. Systemy kontrolne bez inokulacji grzybów włączono w celu uwzględnienia niebiologicznych zmian stężenia zanieczyszczeń. Łącznie eksperymenty te umożliwiły określenie funkcjonalnych ograniczeń, stabilności oraz wrażliwości środowiskowej degradacji zanieczyszczeń pochodzenia naturalnego z udziałem grzybów.

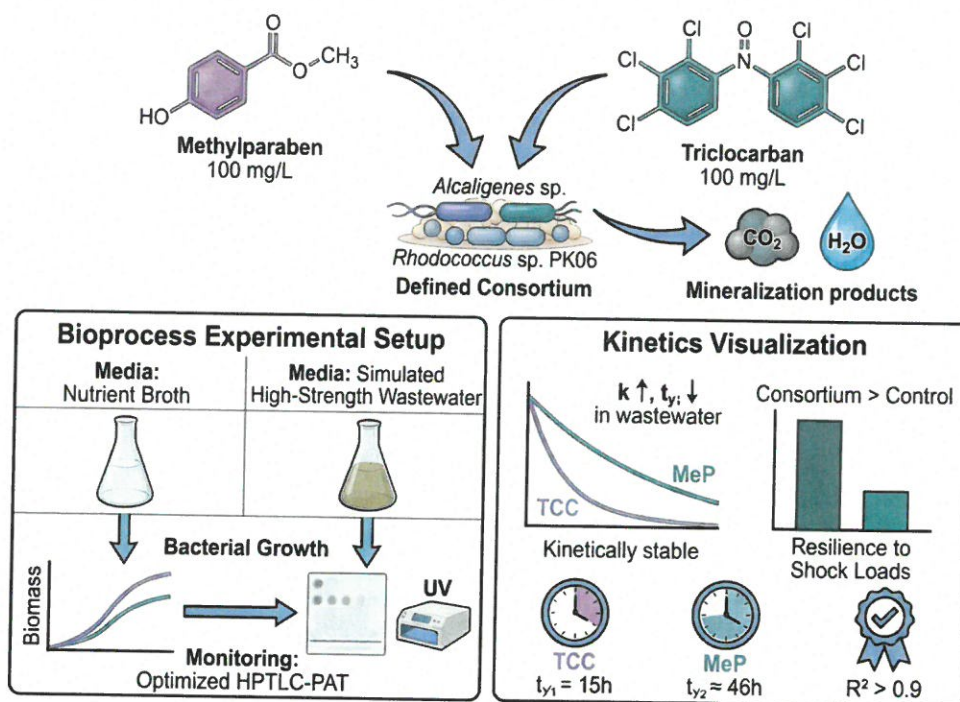
2.1.2 Systemy bakteryjne dla zanieczyszczeń antropogenicznych

Eksperymenty biodegradacji bakteryjnej przeprowadzono z wykorzystaniem zdefiniowanego konsorcjum bakterii obejmującego *Rhodococcus sp.* oraz *Alcaligenes sp.*, wybranych ze względu na ich udokumentowaną zdolność do degradacji strukturalnie złożonych związków organicznych. W przeciwieństwie do systemów grzybowych bakterie łatwo namnażają się w środowisku ciekłym, dlatego wstępne eksperymenty adaptacyjne nie były wymagane przed badaniami biodegradacyjnymi.

Eksperymenty biodegradacji w systemach okresowych prowadzono w warunkach tlenowych, wykorzystując zarówno pożywkę bogatą w składniki odżywcze, jak i syntetyczne ścieki, aby ocenić skuteczność degradacji odpowiednio w warunkach optymalnych oraz ograniczonej dostępności składników odżywczych. Takie porównanie umożliwiło bezpośrednią ocenę możliwości zastosowania bakterii w środowiskowo istotnych matrycach wodnych. Eksperymenty przeprowadzono przy określonym obciążeniu zanieczyszczeniami oraz z próbkowaniem w czasie w celu analizy kinetyki degradacji i stabilności systemu (Rysunek 2).

Utrzymywano również systemy kontrolne w celu rozróżnienia degradacji biologicznej od strat abiotycznych lub aktywności mikroorganizmów tła. Zastosowanie identycznej logiki eksperymentalnej dla obu typów mediów umożliwiło uzyskanie podstaw mechanistycznych do

oceny środowiskowej przydatności bakteryjnej degradacji zanieczyszczeń antropogenicznych [30,33,34].



Rysunek 2. Graficzna reprezentacja bakteryjnej degradacji metyloparabenu i triklokarbanilidu oraz analizy metodą HPTLC.

We wszystkich eksperymentach laboratoryjnych strategię inokulacji mikroorganizmów zaprojektowano w taki sposób, aby zapewnić szybkie ustanowienie aktywnej biomasy oraz powtarzalną wydajność degradacji przy podwyższonym obciążeniu zanieczyszczeniami. W systemach grzybowych zastosowano inokulację w fazie ciekłej w celu równomiernego rozproszenia zarodników i fragmentów grzybni, natomiast w systemach bakteryjnych wykorzystano standaryzowane kultury ciekłe w celu zapewnienia jednolitego wprowadzenia biomasy. Takie dostosowane podejścia były niezbędne do utrzymania aktywności mikroorganizmów w środowiskach wodnych ubogich w składniki odżywcze oraz do umożliwienia rzetelnej interpretacji wyników biodegradacji.

2.2 Biomimetyczny system sztucznego mokradła w skali pilotażowej

W celu wypełnienia luki pomiędzy badaniami biodegradacji w skali laboratoryjnej a systemami oczyszczania funkcjonującymi w rzeczywistych warunkach środowiskowych opracowano biomimetyczny system sztucznego mokradła w skali pilotażowej. Chociaż eksperymenty laboratoryjne dostarczają wiedzy mechanistycznej w kontrolowanych warunkach, nie uwzględniają heterogeniczności przestrzennej, interakcji roślina–mikroorganizm ani długoterminowej stabilności operacyjnej. System mokradła zaprojektowano zatem jako platformę pośrednią, która zachowuje złożoność ekologiczną, jednocześnie umożliwiając kontrolę eksperymentalną.

System mokradła skonfigurowano jako reaktor o poziomym przepływie podpowierzchniowym z warstwowym porowatym podłożem oraz roślinnością bagienną (makrofitami). Jako matrycę wodną zastosowano syntetyczne ścieki, aby zapewnić powtarzalność i ograniczyć zmienność

związaną z rzeczywistymi wodami dopływowymi. Do dopływu dodano mieszaninę zanieczyszczeń obejmującą kofeinę, metyloparaben oraz triklokarbanilid, reprezentującą zarówno naturalne, jak i antropogeniczne klasy zanieczyszczeń w warunkach jednoczesnej ekspozycji [35–39].

Utworzono cztery konfiguracje systemu mokradła w celu oceny mechanizmów biodegradacji na poziomie całego systemu: system z bakteriami, system z grzybami, system z konsorcjum grzybowo-bakteryjnym oraz system kontrolny bez inokulacji. Projekt ten umożliwił bezpośrednie porównanie strategii jednoorganizmowych i dwuorganizmowych w identycznych warunkach hydraulicznych i strukturalnych. Napowietrzanie oraz temperatura zostały dostosowane do wymagań metabolicznych wybranych mikroorganizmów przy zachowaniu porównywalności między systemami.

Strategie inokulacji mikroorganizmów zostały specjalnie dostosowane do pracy w skali mokradła. W systemach bakteryjnych zastosowano inokulację w fazie ciekłej w celu szybkiego rozproszenia bakterii i tworzenia biofilmu w wodzie porowej, natomiast w systemach grzybowych zastosowano inokulację w fazie stałej u podstawy podłoża, co umożliwiło wytworzenie stabilnej, odpornej hydraulicznie sieci grzybni. System kombinowany integrował oba podejścia, wykorzystując funkcjonalną komplementarność mikroorganizmów. Roślinność wprowadzono głównie w celu zapewnienia stabilności strukturalnej, wspierania kolonizacji mikroorganizmów oraz rozwoju strefy ryzosfery, a nie bezpośredniego poboru zanieczyszczeń.

Parametry operacyjne, takie jak pH oraz wzrost roślin, monitorowano w trakcie całego eksperymentu w celu oceny stabilności systemu i pośrednio aktywności mikroorganizmów. Analizy degradacji próbek z mokradła prowadzono po osiągnięciu stabilnego etapu pracy systemu, aby odróżnić trwałą biodegradację od przejściowych efektów adsorpcji lub adaptacji mikroorganizmów. Eksperymenty w skali pilotażowej umożliwiły ocenę adaptacji mikroorganizmów, synergicznych mechanizmów degradacji oraz możliwości skalowania inżynierskich strategii samooczyszczania w warunkach mieszaniny zanieczyszczeń.

3. Strategia analityczna i walidacyjna

Wiarygodna ocena biologicznie napędzanej degradacji zanieczyszczeń wymaga zastosowania metod analitycznych, które łącznie zapewniają identyfikację chemiczną, dokładność oznaczania stężeń oraz interpretowalność wyników w różnych skalach eksperymentalnych i przy zróżnicowanej złożoności matrycy. W niniejszym badaniu zastosowano zintegrowany system analityczny w celu walidacji skuteczności mikrobiologicznego samooczyszczania od systemów laboratoryjnych po pilotażowy biomimetyczny system mokradła. Zamiast polegać na jednej technice, wykorzystano komplementarne analizy spektroskopowe, chromatograficzne oraz strukturalne, zapewniające niezależne i wzajemnie uzupełniające się dowody.

Techniki spektroskopowe wykorzystano jako podstawowe narzędzia do potwierdzania tożsamości chemicznej oraz analizy transformacji zanieczyszczeń pochodzenia naturalnego. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR) została zastosowana wyłącznie na etapie przygotowawczym w celu potwierdzenia integralności strukturalnej kofeiny i nikotyny wyekstrahowanych z naturalnych źródeł. Pozwoliło to upewnić się, że kolejne eksperymenty biodegradacji prowadzone były z użyciem chemicznie niezmiennych związków macierzystych, a obserwowane zmiany stężeń wynikały z aktywności biologicznej,

a nie artefaktów ekstrakcji. FT-IR nie stosowano do analizy próbek biodegradacyjnych, ponieważ jego selektywność jest ograniczona w biologicznie złożonych matrycach [40,41].

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) stanowiła główną technikę analityczną do ilościowej i jakościowej walidacji procesów biodegradacji. Ilościowy NMR (qNMR) wykorzystano do oznaczania absolutnych stężeń kofeiny i nikotyny przed rozpoczęciem eksperymentów biodegradacyjnych, zapewniając kalibracyjnie niezależne oznaczenia oparte na integracji sygnałów protonowych. Podejście to zapewniło wysoką dokładność i powtarzalność dla związków pochodzenia naturalnego bez konieczności stosowania zewnętrznych krzywych kalibracyjnych. W późniejszych etapach analizy jakościowej NMR użyto do monitorowania zmian stężeń związanych z degradacją mikrobiologiczną zarówno w systemach laboratoryjnych, jak i w systemie mokradła. Zanik sygnałów rezonansowych związków macierzystych stanowił bezpośredni dowód biodegradacji w ustabilizowanych warunkach pracy. Ograniczenia wynikające z rozpuszczalności analitów zostały uwzględnione, a związki nieodpowiednie do analizy NMR w wybranych warunkach nie były analizowane tą metodą [42–44].

Analiza chromatograficzna została zastosowana w celu wiarygodnego oznaczania zanieczyszczeń antropogenicznych w biologicznie złożonych układach ciekłych. Wysokosprawną chromatografię cienkowarstwową (HPTLC) wybrano jako podstawową metodę monitorowania metyloparabenu i triklokarbanilidu w eksperymentach biodegradacji bakteryjnej. HPTLC charakteryzuje się wysoką tolerancją na złożone matryce, umożliwia jednocześnie przetwarzanie wielu próbek oraz zapewnia powtarzalne dane stężeniowe w czasie dla związków hydrofobowych i półpolarnych. Opracowanie i walidacja metody zapewniły specyficzne wykrywanie związków oraz wiarygodne oznaczenia ilościowe podczas eksperymentów degradacyjnych prowadzonych zarówno w warunkach bogatych w składniki odżywcze, jak i w warunkach ich ograniczonej dostępności. Oddzielenie chromatograficznej analizy ilościowej od spektroskopowej analizy transformacji pozwoliło uniknąć nakładania się wyników analitycznych i błędnej interpretacji [45].

W celu wsparcia interpretacji funkcjonowania systemu w skali całego układu zastosowano również skaningową mikroskopię elektronową (SEM) jako narzędzie uzupełniające o charakterze strukturalnym. SEM wykorzystano wyłącznie do wizualizacji morfologii podłoża, przyczepności mikroorganizmów oraz rozwoju biofilmu w matrycy mokradła. Analiza ta dostarczyła fizycznych dowodów kolonizacji mikroorganizmów i przydatności podłoża, potwierdzając, że zaprojektowane środowisko mokradła umożliwia stabilną retencję mikroorganizmów oraz ich przestrzenną organizację. Obserwacje SEM nie były jednak wykorzystywane do wnioskowania o mechanizmach degradacji chemicznej, lecz jedynie do potwierdzenia fizycznej i biologicznej integralności systemu oczyszczania.

Zastosowana strategia analityczna zapewniła wysoką wiarygodność danych dzięki niezależności metodologicznej oraz funkcjonalnej komplementarności zastosowanych technik. Tożsamość chemiczna i transformacje związków były potwierdzane metodami spektroskopowymi, zmiany stężeń oznaczano metodami chromatograficznymi, a funkcjonowanie systemu biologicznego wspierano analizą strukturalną. Tak wielowarstwowy system walidacji ograniczył ryzyko błędów analitycznych, uwzględnił ograniczenia wynikające ze specyfiki matryc oraz zapewnił solidną podstawę interpretacji wyników biodegradacji w różnych skalach eksperymentalnych. W rezultacie dowody analityczne potwierdzające mikrobiologiczne samooczyszczanie w niniejszym badaniu są spójne,

wiarygodne i odpowiednie do oceny inżynierskich biologicznych systemów oczyszczania w warunkach środowiskowo istotnych.

4. Wyniki

4.1 Wydajność biodegradacji w skali laboratoryjnej

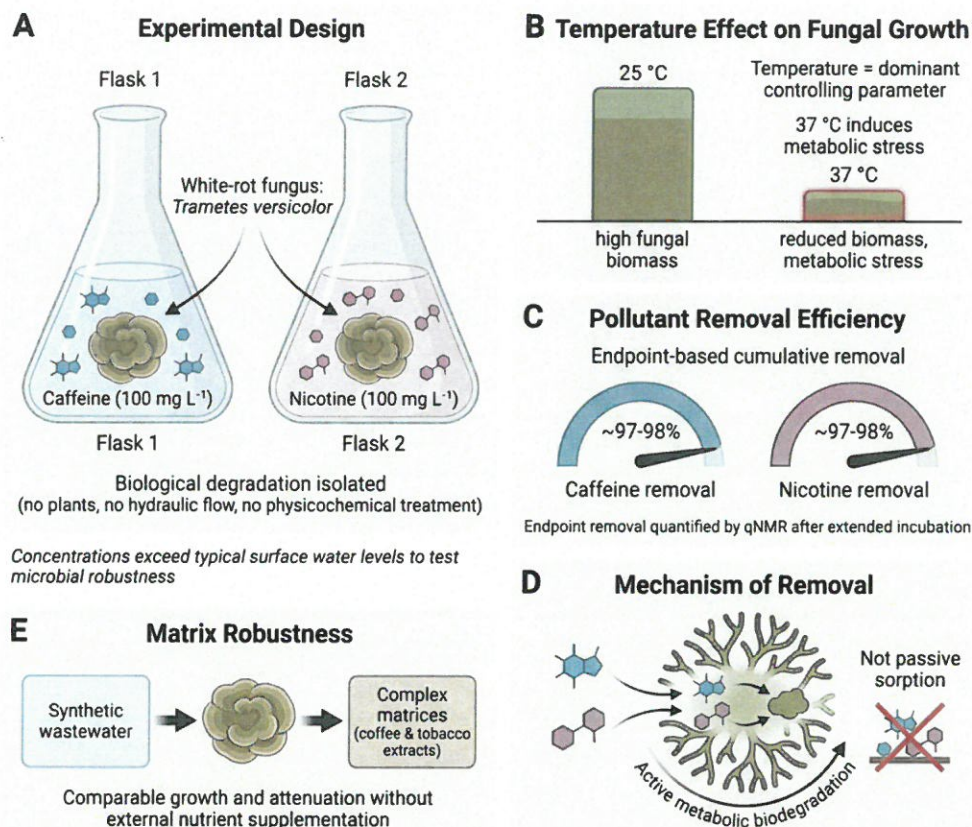
Eksperymenty laboratoryjne zaprojektowano w taki sposób, aby wyizolować biologiczne mechanizmy degradacji od efektów hydraulicznych, oddziaływań roślin oraz czynników fizykochemicznych, tworząc tym samym podstawę mechanistyczną dla inżynierskiego podejścia do samooczyszczania. Zbadano dwie odmienne klasy zanieczyszczeń z wykorzystaniem funkcjonalnie dopasowanych systemów mikrobiologicznych: zanieczyszczenia naturalne (kofeina i nikotyna) z użyciem degradacji grzybowej oraz zanieczyszczenia antropogeniczne (metyloparaben i triklokarbanilid) z wykorzystaniem konsorcjum bakteryjnego. We wszystkich eksperymentach stężenia zanieczyszczeń były celowo wyższe niż typowo spotykane w wodach powierzchniowych, aby ocenić odporność mikroorganizmów w warunkach konserwatywnego stresu środowiskowego.

4.1.1 Zanieczyszczenia naturalne – systemy grzybowe

Grzyb białej zgnilizny *Trametes versicolor* wykazał wysoką tolerancję, zdolność adaptacji oraz potencjał biodegradacyjny wobec kofeiny i nikotyny. Testy inhibicji wzrostu oraz analiza akumulacji biomasy potwierdziły, że żaden z tych związków nie wykazywał ostrej toksyczności przy zastosowanym stężeniu roboczym (100 mg L^{-1}), pod warunkiem utrzymania odpowiednich warunków środowiskowych, zwłaszcza temperatury. Temperatura okazała się kluczowym czynnikiem kontrolującym proces – przy 25°C obserwowano stabilny wzrost grzybnia i rozwój biomasy, natomiast 37°C powodowało wyraźny stres metaboliczny.

W warunkach zoptymalizowanych analiza ilościowa metodą NMR przeprowadzona na końcowym etapie inkubacji wykazała łączną skuteczność usuwania kofeiny na poziomie około 97–98% oraz ponad 98% dla nikotyny po dłuższym okresie inkubacji. Usuwanie zanieczyszczeń było konsekwentnie związane z istotnym przyrostem biomasy grzybowej, co wskazuje, że proces degradacji był wynikiem aktywnego metabolizmu, a nie pasywnej sorpcji. Zarówno syntetyczne ścieki, jak i złożone matryce (ekstrakty kawy i tytoniu) wspierały porównywalny wzrost grzybów oraz redukcję zanieczyszczeń, co dowodzi, że *T. versicolor* może wykorzystywać składniki odżywcze pochodzące ze ścieków bez konieczności dodatkowej suplementacji (Rysunek 3).

Lab-Scale Biodegradation of Caffeine and Nicotine by *Trametes versicolor*



Rysunek 3. (A) Biodegradacja kofeiny i nikotyny (100 mg L⁻¹) w skali laboratoryjnej przez grzyb białej zgnilizny *Trametes versicolor*. (B) Wpływ temperatury na wzrost grzybów przy 25 °C i 37 °C. (C) Usuwanie zanieczyszczeń określone metodą qNMR na końcowym etapie eksperymentu, wykazujące łączną skuteczność degradacji około 97–98%. (D) Mechanizm usuwania zanieczyszczeń przez grzyby zdominowany przez aktywny metabolizm. (E) Adaptacja grzybów i ich odporność w syntetycznych ściekach oraz złożonych matrycach w warunkach ograniczonej dostępności składników odżywczych.

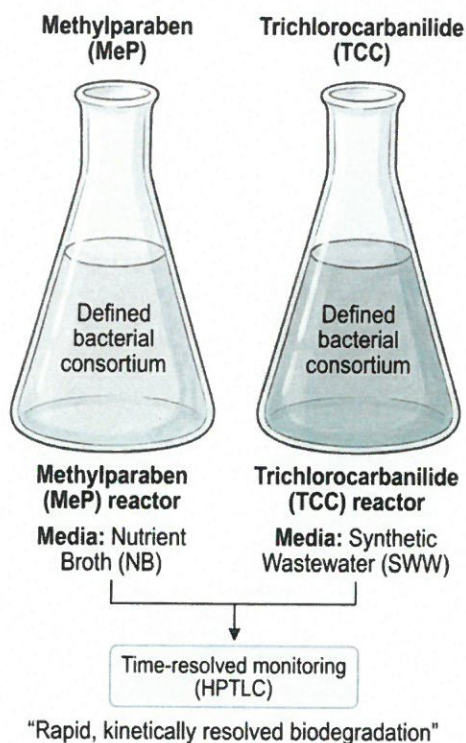
Nikotyna stanowiła większe obciążenie fizjologiczne niż kofeina, szczególnie w warunkach kwaśnych oraz przy podwyższonej temperaturze, jednak mimo to obserwowano utrzymanie wzrostu oraz wysoką końcową skuteczność usuwania. Potwierdza to zdolność systemów grzybowych do tolerowania i transformacji biologicznie aktywnych alkaloidów w długich skalach czasowych, co jest zgodne z ich rolą w naturalnych procesach samooczyszczania. Jednocześnie długi okres adaptacji oraz powolny, lecz systematyczny przebieg degradacji wskazują, że degradacja grzybowa odpowiada głównie za długoterminową, kumulatywną redukcję zanieczyszczeń, a nie za szybkie procesy kinetyczne [26,46,47].

4.1.2 Zanieczyszczenia antropogeniczne – systemy bakteryjne

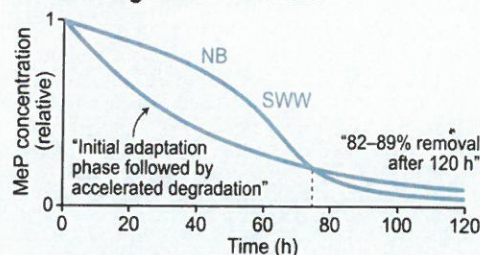
W przeciwieństwie do systemów grzybowych konsorcjum bakteryjne wykazało szybki i wyraźny kinetyczny charakter degradacji zanieczyszczeń antropogenicznych. Analiza HPTLC prowadzona w czasie wykazała skuteczną biodegradację zarówno metyloparabenu (MeP), jak i triklokarbanilidu (TCC) w pożywce odżywczej oraz w syntetycznych ściekach.

Lab-Scale Biodegradation of Anthropogenic Pollutants by a Bacterial Consortium

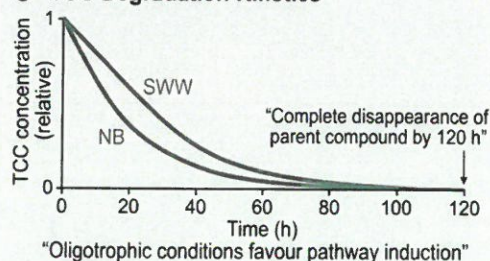
A Experimental Setup



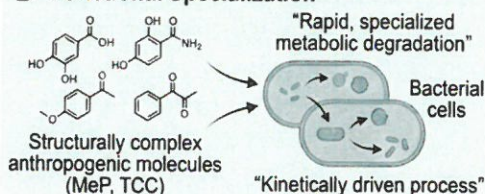
B MeP Degradation Kinetics



C TCC Degradation Kinetics



D Functional Specialization



Rysunek 4. (A) Biodegradacja metyloparabenu (MeP) i triklokarbanilidu (TCC) w skali laboratoryjnej przez konsorcjum bakteryjne w pożywce NB i syntetycznych ściekach (SWW). (B) Degradacja MeP z fazą adaptacji oraz usunięciem na poziomie 82–89% w ciągu 120 godzin. (C) Szybka degradacja TCC z całkowitym zanikiem związku macierzystego w ciągu 120 godzin. (D) Kinetycznie kontrolowany metabolizm bakteryjny zanieczyszczeń antropogenicznych.

W przypadku metyloparabenu degradacja przebiegała stopniowo po początkowej fazie adaptacji mikroorganizmów. Po 120 godzinach usunięcie zanieczyszczenia osiągnęło poziom 82–89%. Pożywka bogata w składniki odżywcze sprzyjała nieco szybszej aktywności we wczesnej fazie procesu, natomiast syntetyczne ścieki wykazywały wyższą efektywność degradacji w środkowej fazie po okresie adaptacji mikroorganizmów. Zjawisko to wskazuje na metaboliczne preferencyjne wykorzystanie związku docelowego w warunkach ograniczonej dostępności składników odżywczych, co ma istotne znaczenie dla rzeczywistych systemów oczyszczania ścieków (Rysunek 4).

Triklokarbanilid ulegał jeszcze szybszej degradacji – całkowite zaniknięcie sygnału związku macierzystego obserwowano w ciągu 120 godzin w obu typach mediów. Co istotne, syntetyczne ścieki umożliwiały szybsze usuwanie zanieczyszczenia na wczesnym etapie procesu niż pożywka odżywcza, co sugeruje, że warunki ograniczonej dostępności składników odżywczych sprzyjały aktywacji szlaków degradacyjnych dla tego trudniej degradowalnego chlorowanego związku. Konsorcjum bakteryjne wykazało zatem wysoką specjalizację funkcjonalną w degradacji strukturalnie złożonych zanieczyszczeń antropogenicznych [6,48–51].

Łącznie wyniki uzyskane w skali laboratoryjnej wskazują wyraźny podział funkcjonalny: systemy grzybowe zapewniają powolną, lecz trwałą degradację zanieczyszczeń naturalnych, natomiast konsorcja bakteryjne umożliwiają szybkie i efektywne usuwanie zanieczyszczeń antropogenicznych. Zróżnicowanie to stanowi biologiczną podstawę projektowania strategii inżynierskiego samooczyszczania dopasowanych do charakterystyki chemicznej zanieczyszczeń.

4.2 Wydajność systemu mokradła w skali pilotażowej

W celu oceny możliwości skalowania systemów mikrobiologicznych zostały one zintegrowane z biomimetycznym systemem sztucznego mokradła pracującym w trybie okresowym przy obciążeniu mieszaniną zanieczyszczeń. Analizowano trzy konfiguracje biologiczne: mokradło A (system bakteryjny), mokradło B (system grzybowy) oraz mokradło C (konsorcjum grzybowo-bakteryjne), a także system kontrolny bez inokulacji.

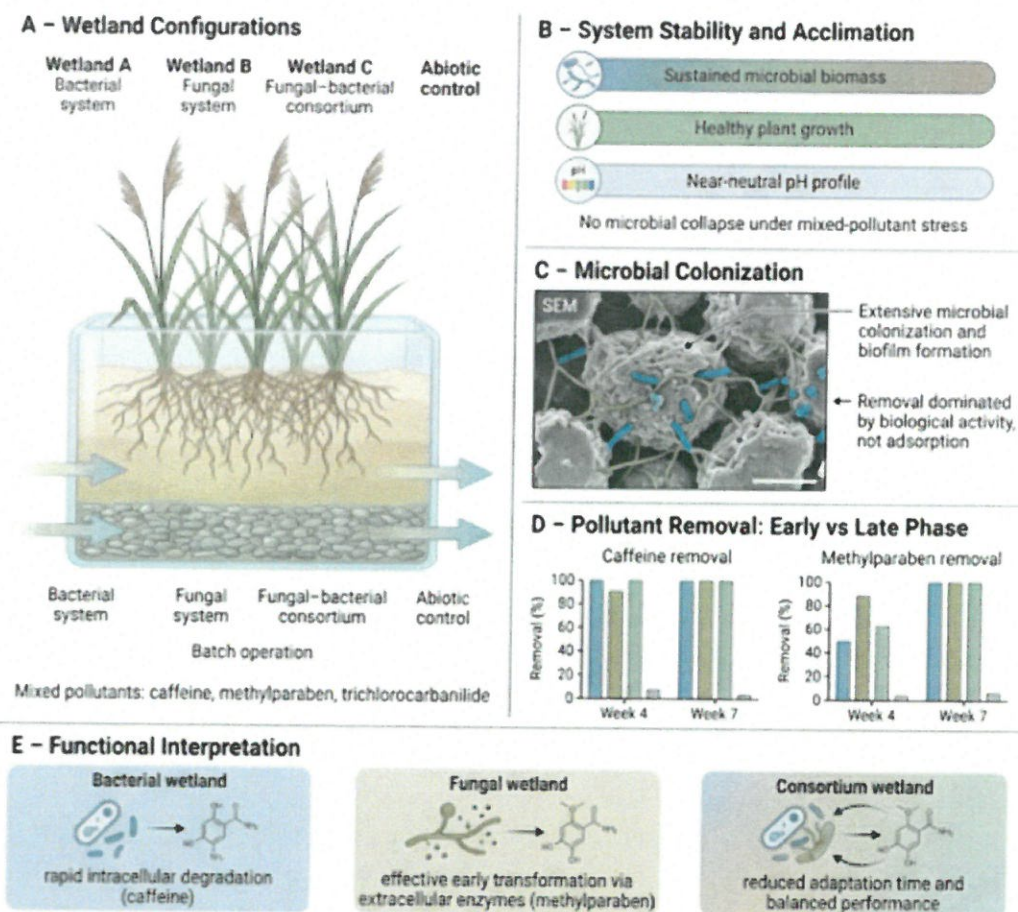
Wszystkie mokradła z bioaugmentacją osiągnęły stabilną pracę po początkowej fazie aklimatyzacji. Wskaźniki stabilności obejmowały utrzymujący się wzrost mikroorganizmów w warunkach stresu związanego z mieszaniną zanieczyszczeń, stabilny rozwój roślin (*Phragmites australis*) oraz stabilne wartości pH w zakresie zbliżonym do obojętnego. Ani populacje grzybów, ani bakterii nie uległy załamaniu przy jednoczesnej ekspozycji na kofeinę, metyloparaben i triklokarbanilid, co potwierdza, że środowisko mokradła zapewniało długotrwałą żywotność mikroorganizmów, a nie jedynie ich krótkotrwałe przetrwanie [52,53].

Analiza SEM dostarczyła strukturalnego potwierdzenia intensywnej kolonizacji mikroorganizmów na porowatym podłożu. Wyniki te wskazują, że matryca mokradła stanowi stabilne rusztowanie dla rozwoju biofilmu i retencji biomasy, co wspiera interpretację usuwania zanieczyszczeń jako biologicznie napędzanego procesu samooczyszczania, a nie dominującej adsorpcji.

W początkowej fazie oczyszczania zaobserwowano wyraźne różnice między konfiguracjami systemu. W przypadku kofeiny całkowity zanik sygnałów NMR nastąpił w 4. tygodniu w systemach bakteryjnym (A) i konsorcyjnym (C), natomiast system grzybowy (B) osiągnął około 90% usunięcia w tym samym czasie i pełną degradację dopiero w 7. tygodniu. Wynik ten wskazuje na wysoką skuteczność wewnątrzkomórkowych szlaków bakteryjnych w szybkiej degradacji kofeiny, dodatkowo wspieranych przez wyższą temperaturę pracy systemu.

W przypadku metyloparabenu zaobserwowano odmienny wzorzec. W 4. tygodniu najwyższą skuteczność osiągnął system grzybowy (~89%), następnie system konsorcyjny (~63%), a najniższą system bakteryjny (~50%). Podkreśla to skuteczność zewnątrzkomórkowych enzymów oksydacyjnych grzybów w początkowej transformacji aromatycznych estrów. Do 7. tygodnia wszystkie biologiczne systemy mokradeł wykazały całkowity zanik sygnałów metyloparabenu (Rysunek 5) [54–58].

Pilot-Scale Performance of Bio-Augmented Constructed Wetlands under Mixed-Pollutant Loading



Rysunek 5. Schematyczny diagram (A) pilotażowego systemu sztucznego mokradła z porowatym podłożem obsadzonym roślinnością (*Phragmites australis*). (B) Stabilność systemu i proces aklimatyzacji we wszystkich konfiguracjach mokradła. (C) Wizualizacja kolonizacji mikroorganizmów na podłożu mokradła przy użyciu SEM. (D) Wydajność usuwania zanieczyszczeń w biologicznych systemach mokradła. (E) Degradacja zanieczyszczeń napędzana aktywnością metaboliczną mikroorganizmów.

System konsorcjalny nie zawsze wykazywał najwyższą wydajność w początkowej fazie adaptacji, jednak konsekwentnie skracał czas aklimatyzacji, przyspieszał stabilizację systemu i wykazywał większą odporność w warunkach mieszaniny zanieczyszczeń, zapewniając zrównoważoną efektywność degradacji dla różnych związków. Wskazuje to na komplementarność funkcjonalną mikroorganizmów, a nie prosty efekt synergii addytywnej, co ma kluczowe znaczenie dla projektowania systemów.

4.3 Interpretacja systemowa i implikacje skalowania

Na poziomie całego systemu wyniki potwierdzają, że samooczyszczanie nie jest pojedynczym procesem, lecz właściwością emergentną wynikającą z interakcji między adaptacją mikroorganizmów, właściwościami chemicznymi zanieczyszczeń oraz strukturą środowiska. Eksperymenty laboratoryjne umożliwiły identyfikację mechanizmów biodegradacji

specyficznych dla poszczególnych związków, natomiast system mokradła potwierdził ich trwałość w warunkach zwiększonej złożoności ekologicznej.

Przejście od systemów laboratoryjnych do mokradeł wykazało, że mechanizmy mikrobiologicznego samooczyszczania mogą być skalowane, jeśli zapewniona jest odpowiednia struktura przestrzenna, retencja biomasy oraz warunki ograniczonej dostępności składników odżywczych. Syntetyczne ścieki konsekwentnie wspierały aktywność mikroorganizmów w obu skalach eksperymentalnych, co potwierdza, że skuteczna biodegradacja nie wymaga zewnętrznej suplementacji składników odżywczych.

Synergia mikrobiologiczna okazała się raczej zasadą projektową niż uniwersalnym mnożnikiem wydajności. Grzyby zapewniały stabilność systemu, zewnątrzkomórkowe procesy oksydacyjne oraz tolerancję wobec złożonych matryc, natomiast bakterie odpowiadały za wysoką efektywność kinetyczną i szybki obrót metabolitów. Integracja tych systemów zmniejszała podatność systemu na zakłócenia i skracała czas oczyszczania, zwłaszcza w warunkach mieszaniny zanieczyszczeń.

Wyniki te potwierdzają, że inżynieryjne mikrobiologiczne samooczyszczanie może być świadomie wzmacniane i przenoszone z kontrolowanych eksperymentów laboratoryjnych do systemów sztucznych mokradeł. Potwierdza to centralną tezę rozprawy doktorskiej: procesy samooczyszczania wód powierzchniowych można skutecznie wzmacniać poprzez projektowanie systemów mikrobiologicznych dopasowanych do charakterystyki zanieczyszczeń, zamiast polegać wyłącznie na pasywnej naturalnej atenuacji.

5. Wnioski i znaczenie badań

Niniejsza praca doktorska wykazała, że mikrobiologiczne procesy samooczyszczania zanieczyszczonych wód powierzchniowych mogą być celowo wzmacniane poprzez inżynieryjne projektowanie systemów biologicznych, zamiast polegać wyłącznie na naturalnych procesach pasywnej atenuacji. Dzięki systematycznemu przejściu od kontrolowanych eksperymentów laboratoryjnych do biomimetycznego systemu sztucznego mokradła w skali pilotażowej zweryfikowano skalowalny model degradacji chemicznie zróżnicowanych zanieczyszczeń nowo pojawiających się w warunkach środowiskowo istotnych.

W skali laboratoryjnej badania jednoznacznie wykazały zróżnicowane role funkcjonalne systemów grzybowych i bakteryjnych. Eksperymenty z udziałem grzyba *Trametes versicolor* potwierdziły jego wysoką skuteczność w transformacji alkaloidów pochodzenia naturalnego, takich jak kofeina i nikotyna, w warunkach wodnych o ograniczonej dostępności składników odżywczych. Skuteczność usuwania przekraczająca 97–98% była osiągana zarówno w syntetycznych ściekach, jak i w złożonych matrycach naturalnych, co wskazuje, że systemy grzybowe mogą adaptować się z warunków laboratoryjnych do środowisk ściekowych i utrzymywać biodegradację wykorzystując wyłącznie składniki odżywcze obecne w ściekach. Wyniki te wskazują na dużą przydatność grzybów w długoterminowej degradacji biologicznie aktywnych zanieczyszczeń naturalnych.

Z kolei eksperymenty bakteryjne wykazały wysoką efektywność kinetyczną oraz odporność metaboliczną konsorcjów bakteryjnych wobec zanieczyszczeń antropogenicznych. Całkowite usunięcie triklokarbanilidu oraz wysoka skuteczność degradacji metyloparabenu zostały osiągnięte w stosunkowo krótkim czasie, nawet w warunkach ograniczonej dostępności

składników odżywczych. Co istotne, syntetyczne ścieki często zapewniały efektywność degradacji porównywalną lub wyższą niż pożywki bogate w składniki odżywcze po okresie adaptacji mikroorganizmów, co wskazuje, że ograniczenie składników odżywczych może stymulować wykorzystanie zanieczyszczeń jako substratu metabolicznego zamiast je hamować. Wynik ten podważa założenie, że czyste pożywki laboratoryjne stanowią optymalne środowisko dla biodegradacji i podkreśla znaczenie systemów opartych na matrycach ściekowych.

Eksperymenty w skali pilotażowej wykazały, że zdolności degradacyjne mikroorganizmów mogą być stabilizowane i utrzymywane w inżynierskim systemie ekologicznym. Mokradła obsadzone rośliną *Phragmites australis* skutecznie wspierały konfiguracje grzybowe, bakteryjne oraz mieszane w warunkach obciążenia mieszaniną zanieczyszczeń podczas długotrwałej eksploatacji. Wszystkie systemy biologiczne zachowały stabilność operacyjną, utrzymując zbuforowane wartości pH oraz stabilny wzrost roślin, co potwierdza skuteczną integrację ekologiczną systemu.

Zachowanie poszczególnych zanieczyszczeń w systemie mokradła podkreśliło znaczenie różnic funkcjonalnych między mikroorganizmami. Systemy bakteryjne wykazały szybkie usuwanie kofeiny, natomiast systemy grzybowe wykazywały wyższą skuteczność we wczesnej fazie degradacji metyloparabenu. System konsorcjalny nie tylko odtwarzał zachowanie pojedynczych kultur, lecz zapewniał bardziej zrównoważoną degradację różnych związków oraz skracał czas adaptacji w warunkach mieszaniny zanieczyszczeń. Oznacza to, że przewaga konsorcjów mikrobiologicznych wynika nie z prostego efektu addytywnego, lecz z komplementarności funkcjonalnej, w której różne mechanizmy metaboliczne i enzymatyczne umożliwiają degradację złożonych mieszanin związków.

Łącznie uzyskane wyniki wskazują, że biomimetyczne sztuczne mokradła mogą stanowić efektywne systemy samooczyszczania wód powierzchniowych. Zastosowana konfiguracja inżynierska zapewniała retencję biomasy, organizację przestrzenną oraz stabilizację warunków środowiskowych, umożliwiając długotrwałą aktywność mikroorganizmów przy wysokim obciążeniu zanieczyszczeniami bez konieczności dostarczania dodatkowych składników odżywczych lub stosowania energochłonnych technologii.

Z perspektywy środowiskowej praca ta wskazuje, że zanieczyszczone wody powierzchniowe mogą funkcjonować jako aktywne matryce biodegradacyjne, a nie jedynie jako bierne nośniki zanieczyszczeń. Wykorzystanie naturalnej złożoności składników odżywczych oraz projektowanie społeczności mikroorganizmów o komplementarnych funkcjach pozwala w sposób kontrolowany i przewidywalny wzmacniać procesy samooczyszczania.

Pod względem praktycznym wyniki badań wspierają rozwój niskoenergetycznych, biologicznie napędzanych strategii oczyszczania wód powierzchniowych zanieczyszczonych mieszaniną związków naturalnych i antropogenicznych. Zaproponowane zasady projektowania systemów mikrobiologicznych oraz koncepcja mokradeł bioaugmentowanych stanowią solidną podstawę do dalszego wdrażania takich technologii jako zrównoważonych narzędzi ochrony i rekultywacji wód powierzchniowych.

Bibliografia:

1. Akhiladas, E.K.; Chakraborty, S. Bioremediation of Petroleum Refinery Wastewater Using Constructed Wetlands: A Focus on Microbial Diversity and Pollutant Degradation. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2025**, *204*, 106152, doi:10.1016/j.ibiod.2025.106152.
2. Dave, B.; Łobos-Moysa, E. A Comprehensive Review of Caffeine and Nicotine as Emerging Environmental Contaminants in Water Systems. *Architecture, Civil Engineering, Environment* **2025**, *18*, 171–190, doi:10.2478/acee-2025-0027.
3. Lavudya, S.; Kalyan, Ch.P.; Sindhu, A.; Shankaraiah, G.; Himabindu, V. Current Challenges and Future Directions of Emerging Contaminants in the Environment. In *Emerging Contaminants in the Environment*; Reddy, K.V., Maddela, N.R., Reddy, A.V.K., Eds.; Emerging Contaminants and Associated Treatment Technologies; Springer Nature Switzerland: Cham, 2026; pp. 455–483 ISBN 978-3-032-10431-1.
4. Rath, B.S.; Kumar, P.S.; Show, P.-L. A Review on Effective Removal of Emerging Contaminants from Aquatic Systems: Current Trends and Scope for Further Research. *Journal of Hazardous Materials* **2021**, *409*, 124413, doi:10.1016/j.jhazmat.2020.124413.
5. Blanco, P.; Hernando-Amado, S.; Reales-Calderon, J.; Corona, F.; Lira, F.; Alcalde-Rico, M.; Bernardini, A.; Sanchez, M.; Martinez, J. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms* **2016**, *4*, 14, doi:10.3390/microorganisms4010014.
6. De Marines, F.; Cruciat, I.; Di Bella, G.; Di Trapani, D.; Giustra, M.G.; Scirè Calabrisotto, L.; Greco Lucchina, P.; Quatrini, P.; Viviani, G. Degradation of 1,2-Dichloroethane in Real Polluted Groundwater by Using Enriched Bacterial Consortia in Aerobic and Anaerobic Laboratory-Scale Conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2023**, *183*, 105644, doi:10.1016/j.ibiod.2023.105644.
7. Helbling, D.E.; Johnson, D.R.; Honti, M.; Fenner, K. Micropollutant Biotransformation Kinetics Associate with WWTP Process Parameters and Microbial Community Characteristics. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 10579–10588, doi:10.1021/es3019012.
8. Johnson, D.R.; Helbling, D.E.; Lee, T.K.; Park, J.; Fenner, K.; Kohler, H.-P.E.; Ackermann, M. Association of Biodiversity with the Rates of Micropollutant Biotransformations among Full-Scale Wastewater Treatment Plant Communities. *Appl Environ Microbiol* **2015**, *81*, 666–675, doi:10.1128/AEM.03286-14.
9. Daneshvar, A.; Aboulfadl, K.; Viglino, L.; Broséus, R.; Sauvé, S.; Madoux-Humery, A.-S.; Weyhenmeyer, G.A.; Prévost, M. Evaluating Pharmaceuticals and Caffeine as Indicators of Fecal Contamination in Drinking Water Sources of the Greater Montreal Region. *Chemosphere* **2012**, *88*, 131–139, doi:10.1016/j.chemosphere.2012.03.016.
10. Mitra, P.; Chatterjee, S.; Paul, N.; Ghosh, S.; Das, M. An Overview of Endocrine Disrupting Chemical Paraben and Search for An Alternative – A Review. *Proc Zool Soc* **2021**, *74*, 479–493, doi:10.1007/s12595-021-00418-x.
11. Mulla, S.I.; Hu, A.; Wang, Y.; Sun, Q.; Huang, S.-L.; Wang, H.; Yu, C.-P. Degradation of Triclocarban by a Triclosan-Degrading *Sphingomonas* Sp. Strain YL-JM2C. *Chemosphere* **2016**, *144*, 292–296, doi:10.1016/j.chemosphere.2015.08.034.
12. Padhiary, S.; Samal, D.; Khandayataray, P.; Murthy, M.K. A Systematic Review Report on Tobacco Products and Its Health Issues in India. *Reviews on Environmental Health* **2021**, *36*, 367–389, doi:10.1515/reveh-2020-0037.
13. Wang, C.-F.; Tian, Y. Reproductive Endocrine-Disrupting Effects of Triclosan: Population Exposure, Present Evidence and Potential Mechanisms. *Environmental Pollution* **2015**, *206*, 195–201, doi:10.1016/j.envpol.2015.07.001.
14. Martin, T.J.; Snape, J.R.; Bartram, A.; Robson, A.; Acharya, K.; Davenport, R.J. Environmentally Relevant Inoculum Concentrations Improve the Reliability of Persistent Assessments in Biodegradation Screening Tests. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51*, 3065–3073, doi:10.1021/acs.est.6b05717.
15. Senturk, E.; Ince, M.; Onkal Engin, G. The Effect of Shock Loading on the Performance of a Thermophilic Anaerobic Contact Reactor at Constant Organic Loading Rate. *J Environ Health Sci Engineer* **2014**, *12*, 84, doi:10.1186/2052-336X-12-84.
16. Barnes, K.K.; Christenson, S.C.; Kolpin, D.W.; Focazio, M.J.; Furlong, E.T.; Zaugg, S.D.; Meyer, M.T.; Barber, L.B. Pharmaceuticals and Other Organic Waste Water Contaminants Within a Leachate Plume Downgradient of a Municipal Landfill. *Groundwater Monitoring & Remediation* **2004**, *24*, 119–126, doi:10.1111/j.1745-6592.2004.tb00720.x.

17. Aus Der Beek, T.; Weber, F.-A.; Bergmann, A.; Hickmann, S.; Ebert, I.; Hein, A.; Küster, A. Pharmaceuticals in the Environment—Global Occurrences and Perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2015**, *35*, 823–835, doi:10.1002/etc.3339.
18. Onesios, K.M.; Yu, J.T.; Bouwer, E.J. Biodegradation and Removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Treatment Systems: A Review. *Biodegradation* **2009**, *20*, 441–466, doi:10.1007/s10532-008-9237-8.
19. Benotti, M.J.; Brownawell, B.J. Microbial Degradation of Pharmaceuticals in Estuarine and Coastal Seawater. *Environmental Pollution* **2009**, *157*, 994–1002, doi:10.1016/j.envpol.2008.10.009.
20. Brix, H. Functions of Macrophytes in Constructed Wetlands. *Water Science and Technology* **1994**, *29*, 71–78, doi:10.2166/wst.1994.0160.
21. Gargallo, S.; Martín, M.; Oliver, N.; Hernández-Crespo, C. Sedimentation and Resuspension Modelling in Free Water Surface Constructed Wetlands. *Ecological Engineering* **2017**, *98*, 318–329, doi:10.1016/j.ecoleng.2016.09.014.
22. Kadlec, R.H.; Wallace, S. *Treatment Wetlands*; 0 ed.; CRC Press, 2008; ISBN 978-0-429-13795-2.
23. Luo, Y.; Guo, W.; Ngo, H.H.; Nghiem, L.D.; Hai, F.I.; Zhang, J.; Liang, S.; Wang, X.C. A Review on the Occurrence of Micropollutants in the Aquatic Environment and Their Fate and Removal during Wastewater Treatment. *Science of The Total Environment* **2014**, *473–474*, 619–641, doi:10.1016/j.scitotenv.2013.12.065.
24. Schwarzenbach, R.P.; Egli, T.; Hofstetter, T.B.; Von Gunten, U.; Wehrli, B. Global Water Pollution and Human Health. *Annu. Rev. Environ. Resour.* **2010**, *35*, 109–136, doi:10.1146/annurev-environ-100809-125342.
25. Dave, B.; Moysa, E.L.; Kuźnik, A. Enhancing Fungal Adaptation for Efficient Caffeine Degradation in Wastewater: Biomimetic Approach and Environmental Optimization. *Desalination and Water Treatment* **2025**, *321*, 100938, doi:10.1016/j.dwt.2024.100938.
26. Dave, B.; Moysa, E.L.; Kuźnik, A. Nicotine Degradation by *Trametes Versicolor*: Insights from Diverse Environmental Stressors and Wastewater Medium. *Molecules* **2025**, *30*, 2658, doi:10.3390/molecules30122658.
27. Veresoglou, S.D.; Wang, D.; Andrade-Linares, D.R.; Hempel, S.; Rillig, M.C. Fungal Decision to Exploit or Explore Depends on Growth Rate. *Microb Ecol* **2018**, *75*, 289–292, doi:10.1007/s00248-017-1053-4.
28. Patel, D.; Pardhi, D.; Rathod, T.; Solanki, A.; Raval, V.; Panchal, R.; Joshi, R.; Rajput, K. Unveiling the Potential of *Bacillus Safensis* PG-54 Isolated from Fermented Panchagavya on Sorghum Bicolor under Salinity Stress. *Discov. Plants* **2025**, *2*, 87, doi:10.1007/s44372-025-00164-w.
29. Vaghela, B.; Vashi, R.; Rajput, K.; Joshi, R. Plant Chitinases and Their Role in Plant Defense: A Comprehensive Review. *Enzyme and Microbial Technology* **2022**, *159*, 110055, doi:10.1016/j.enzmictec.2022.110055.
30. Rodarte-Morales, A.I.; Feijoo, G.; Moreira, M.T.; Lema, J.M. Degradation of Selected Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) by White-Rot Fungi. *World J Microbiol Biotechnol* **2011**, *27*, 1839–1846, doi:10.1007/s11274-010-0642-x.
31. Rodrigues, R.; Oliveira, M.B.P.P.; Alves, R.C. Chlorogenic Acids and Caffeine from Coffee By-Products: A Review on Skincare Applications. *Cosmetics* **2023**, *10*, 12, doi:10.3390/cosmetics10010012.
32. Syamsia, S.; Idhan, A.; Latifah, H.; Noerfityani, N.; Akbar, A. Alternative Medium for the Growth of Endophytic Fungi. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* **2021**, *886*, 012045, doi:10.1088/1755-1315/886/1/012045.
33. Abdelwahab, N.S.; Abdelaleem, E.A.; Abdelrahman, M.M. HPTLC-Densitometric Method for Determination of Ascorbic Acid, Paracetamol and Guaifenesin in Presence of Their Toxic Impurities. *Journal of Chromatographic Science* **2019**, *57*, 149–155, doi:10.1093/chromsci/bmy096.
34. Chouhan, S.; Mulani, R.; Ansari, H.; Sindhav, G.; Rao, P.; Rawal, R.M.; Saraf, M.; Goswami, D. Rapid Method for Detection, Quantification and Measuring Microbial Degradation of Pesticide-Thiram Using High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC). *Environ Sci Pollut Res* **2023**, *30*, 7874–7885, doi:10.1007/s11356-022-22731-4.
35. Das, P.; Mehra, A.; Sachan, S.G.; Chattopadhyay, S. Screening Different Solid Supports for *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Formation and Determining Its Efficiency for Decolorization and Degradation of Congo Red. *Arch Microbiol* **2024**, *206*, 402, doi:10.1007/s00203-024-04125-x.
36. Freeman, A.I.; Widdowson, S.; Murphy, C.; Cooper, D.J. Economic Assessment of Aerated Constructed Treatment Wetlands Using Whole Life Costing. *Water Science and Technology* **2019**, *80*, 75–85, doi:10.2166/wst.2019.246.

37. Gupta, P.; Ann, T.; Lee, S.-M. Use of Biochar to Enhance Constructed Wetland Performance in Wastewater Reclamation. *Environmental Engineering Research* **2016**, *21*, 36–44, doi:10.4491/eer.2015.067.
38. Lu, J.; Guo, C.; Li, J.; Zhang, H.; Lu, G.; Dang, Z.; Wu, R. A Fusant of *Sphingomonas* Sp. GY2B and *Pseudomonas* Sp. GP3A with High Capacity of Degrading Phenanthrene. *World J Microbiol Biotechnol* **2013**, *29*, 1685–1694, doi:10.1007/s11274-013-1331-3.
39. Snyder, B.F. The Inclusion of Ecosystem Service Valuations in Bioenergy Cost Analysis: A Case Study of Constructed Wetlands in the Neotropics. *Ecological Economics* **2019**, *156*, 196–201, doi:10.1016/j.ecolecon.2018.10.005.
40. Abdulwahid, R.T.; Aziz, S.B.; Kadir, M.F.Z. Insights into Ion Transport in Biodegradable Solid Polymer Blend Electrolyte Based on FTIR Analysis and Circuit Design. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* **2022**, *167*, 110774, doi:10.1016/j.jpcs.2022.110774.
41. Oral, H.V.; Carvalho, P.; Gajewska, M.; Ursino, N.; Masi, F.; Hullebusch, E.D.V.; Kazak, J.K.; Exposito, A.; Cipolletta, G.; Andersen, T.R.; et al. A Review of Nature-Based Solutions for Urban Water Management in European Circular Cities: A Critical Assessment Based on Case Studies and Literature. *Blue-Green Systems* **2020**, *2*, 112–136, doi:10.2166/bgs.2020.932.
42. Jang, S.; Kim, H. Direct Chiral¹⁹F NMR Analysis of Fluorine-Containing Analytes and Its Application to Simultaneous Chiral Analysis. *Org. Lett.* **2020**, *22*, 7804–7808, doi:10.1021/acs.orglett.0c02620.
43. Lv, T.-M.; Chen, D.-L.; Liang, J.-J.; Bai, M.; Lin, B.; Huang, X.-X.; Ma, G.-X.; Song, S.-J. Structural Revisions of Two Highly Aromatic Naphthoquinone-Derived Dimers Based on NMR Analysis, Computer-Assisted Structure Elucidation Methods, and Computations. *Org. Lett.* **2021**, *23*, 7231–7235, doi:10.1021/acs.orglett.1c02626.
44. Yao, H.-Y.-Y.; Wang, J.-Q.; Yin, J.-Y.; Nie, S.-P.; Xie, M.-Y. A Review of NMR Analysis in Polysaccharide Structure and Conformation: Progress, Challenge and Perspective. *Food Research International* **2021**, *143*, 110290, doi:10.1016/j.foodres.2021.110290.
45. Borman, P.; Elder, D. Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. In *ICH Quality Guidelines*; Teasdale, A., Elder, D., Nims, R.W., Eds.; Wiley, 2017; pp. 127–166 ISBN 978-1-118-97111-6.
46. Cogo, K.; Montan, M.F.; Bergamaschi, C.D.C.; D. Andrade, E.; Rosalen, P.L.; Groppo, F.C. In Vitro Evaluation of the Effect of Nicotine, Cotinine, and Caffeine on Oral Microorganisms. *Can. J. Microbiol.* **2008**, *54*, 501–508, doi:10.1139/W08-032.
47. Huang, R.; Li, M.; Gregory, R.L. Effect of Nicotine on Growth and Metabolism of *Streptococcus Mutans*. *European J Oral Sciences* **2012**, *120*, 319–325, doi:10.1111/j.1600-0722.2012.00971.x.
48. Duc, H.D. Enhanced Degradation of Sulfamethoxazole Using Immobilized Biomass Reactor. *Environmental Engineering Research* **2022**, *28*, 220213–0, doi:10.4491/eer.2022.213.
49. Saeed, T.; Sun, G. A Comparative Study on the Removal of Nutrients and Organic Matter in Wetland Reactors Employing Organic Media. *Chemical Engineering Journal* **2011**, *171*, 439–447, doi:10.1016/j.cej.2011.03.101.
50. Sandle, T. Selection and Application of Culture Media. In *Biocontamination Control for Pharmaceuticals and Healthcare*; Elsevier, 2019; pp. 103–123 ISBN 978-0-12-814911-9.
51. Wang, L.; Liu, T.; Sun, H.; Zhou, Q. Transesterification of Para-Hydroxybenzoic Acid Esters (Parabens) in the Activated Sludge. *Journal of Hazardous Materials* **2018**, *354*, 145–152, doi:10.1016/j.jhazmat.2018.04.077.
52. Wang, H.; Yun, H.; Li, M.; Cui, H.; Ma, X.; Zhang, Y.; Pei, X.; Zhang, L.; Shi, K.; Li, Z.; et al. Fate, Toxicity and Effect of Triclocarban on the Microbial Community in Wastewater Treatment Systems. *Journal of Hazardous Materials* **2022**, *440*, 129796, doi:10.1016/j.jhazmat.2022.129796.
53. Xu, T.; Chen, J.; Chen, X.; Xie, H.; Wang, Z.; Xia, D.; Tang, W.; Xie, H. Prediction Models on p *K_a* and Base-Catalyzed Hydrolysis Kinetics of Parabens: Experimental and Quantum Chemical Studies. *Environ. Sci. Technol.* **2021**, *55*, 6022–6031, doi:10.1021/acs.est.0c06891.
54. Aleksic, I.; Milivojevic, D. The Plastic-Degrading Capabilities of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Biotechnol Environ* **2025**, *2*, 17, doi:10.1186/s44314-025-00033-6.
55. Banar, M.; Emaneini, M.; Beigverdi, R.; Fanaei Pirlar, R.; Node Farahani, N.; Van Leeuwen, W.B.; Jabalameli, F. The Efficacy of Lyticase and β -Glucosidase Enzymes on Biofilm Degradation of *Pseudomonas Aeruginosa* Strains with Different Gene Profiles. *BMC Microbiol* **2019**, *19*, 291, doi:10.1186/s12866-019-1662-9.

56. Dave, B.; Łobos-Moysa, E.; Kuznik, A.; Maqsood, A.; Appiah, A.N.S.; Krzeszowski, S.; Joshi, R. Enhancing Microbial Biodegradation of PPCPs in Wastewater via Natural Self-Purification in a Novel Constructed Wetland System. *Sustainability* **2026**, *18*, 548, doi:10.3390/su18010548.
57. Mariencheck, W.I.; Alcorn, J.F.; Palmer, S.M.; Wright, J.R. *Pseudomonas Aeruginosa* Elastase Degrades Surfactant Proteins A and D. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2003**, *28*, 528–537, doi:10.1165/rcmb.2002-0141OC.
58. Rezaei, Z.; Moghimi, H. Fungal-Bacterial Consortia: A Promising Strategy for the Removal of Petroleum Hydrocarbons. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2024**, *280*, 116543, doi:10.1016/j.ecoenv.2024.116543.