

Streszczenie

Rosnąca obecność zanieczyszczeń pojawiających się (emerging contaminants, ECs) w środowiskach wodnych stanowi trwałe wyzwanie dla naturalnych procesów samooczyszczania oraz konwencjonalnych systemów oczyszczania ścieków. W naturalnych ekosystemach wodnych procesy samooczyszczania przebiegają pasywnie i są silnie ograniczone zmiennością środowiskową, podczas gdy niniejsze badania traktują samooczyszczanie jako proces celowo projektowany i biologicznie intensyfikowany. Związki takie jak kofeina, nikotyna, metyloparaben (MeP) oraz triklorokarbanilid (TCC) charakteryzują się zróżnicowanymi właściwościami fizykochemicznymi i często ulegają niepełnej eliminacji w wodach powierzchniowych na skutek rozcieńczenia, ograniczeń nutrientowych, konkurencji ekologicznej oraz zmienności warunków środowiskowych. Chociaż mikrobiologiczne procesy samooczyszczania przyczyniają się do transformacji zanieczyszczeń, ich efektywność w warunkach niekontrolowanych pozostaje ograniczona. Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było wzmocnienie biologicznie napędzanych procesów samooczyszczania poprzez selekcję mikroorganizmów specyficznych względem zanieczyszczeń, adaptację mikrobiologiczną do ścieków oraz integrację zaadaptowanych układów grzybowych i bakteryjnych w ramach zaprojektowanego systemu mokradeł sztucznych.

Badania przeprowadzono w dwóch następujących po sobie skalach: laboratoryjnej oraz pilotażowej, obejmującej system mokradeł sztucznych. Oryginalność pracy polegała na zastosowaniu syntetycznych ścieków zaprojektowanych w celu odwzorowania zanieczyszczonych wód powierzchniowych i ścieków, które jednocześnie pełniły funkcję modelowego układu wodnego oraz jedyne źródła składników odżywczych dla wzrostu mikroorganizmów. Wprowadzenie ograniczeń nutrientowych wymusiło bezpośrednie sprzężenie wzrostu mikroorganizmów z metabolizmem zanieczyszczeń, zwiększając tym samym relewantność środowiskową oraz potencjał skalowania w porównaniu z mediami laboratoryjnymi zoptymalizowanymi pod kątem wzrostu. Strategia ta została celowo zaprojektowana w celu odejścia od klasycznych pożywek laboratoryjnych oraz wzmocnienia degradacji zanieczyszczeń poprzez zmuszenie mikroorganizmów do wykorzystania składników odżywczych pochodzących ze ścieków przy jednoczesnym metabolizowaniu docelowych związków.

Na etapie laboratoryjnym oceniono potencjał biodegradacyjny grzyba białej zgnilizny *Trametes versicolor* wobec kofeiny i nikotyny w kontrolowanych warunkach ograniczenia nutrientowego. Eksperymenty prowadzono przy początkowym stężeniu zanieczyszczeń wynoszącym 100 mg L^{-1} , wykorzystując chemicznie wyekstrahowaną kofeinę i nikotynę pochodzenia naturalnego. Systematycznie badano wpływ temperatury (25 i 37 °C), pH (silnie kwaśne oraz umiarkowanie kwaśne) oraz składu medium (bulion ziemniaczano-glukozowy, syntetyczne ścieki oraz złożone matryce naturalne). Ze względu na długotrwałe fazy adaptacji grzybów oraz powolny przyrost biomasy, biodegradację oceniano metodą punktu końcowego po 45 dniach inkubacji, ponieważ degradacja grzybowa ma charakter kumulatywny, a nie szybki kinetycznie. Tożsamość i stopień usunięcia zanieczyszczeń potwierdzano jakościowo i ilościowo przy użyciu technik spektroskopowych, takich jak FT-IR, ^1H NMR oraz ^{13}C NMR.

Usunięcie kofeiny osiągnęło poziom 97–98% w warunkach umiarkowanie kwaśnych oraz w syntetycznych ściekach w temperaturze 25 °C, co korelowało z maksymalnym przyrostem biomasy grzybowej. Wysoka skuteczność usuwania była utrzymywana w syntetycznych ściekach również w temperaturze 37 °C, co wskazuje, że składniki odżywcze pochodzące ze

ścieków nie tylko podtrzymywały wzrost grzybów, lecz także poprawiały długoterminową efektywność degradacji w warunkach ograniczenia nutrientowego. Usuwanie nikotyny przekraczało 98% w warunkach optymalnych (25 °C, pH ~5,20, syntetyczne ścieki), przy czym spadek wydajności obserwowano jedynie przy jednoczesnym stresie termicznym i kwaśnym. We wszystkich badanych układach zaobserwowano silną dodatnią zależność pomiędzy akumulacją biomasy grzybowej a skumulowanym usuwaniem zanieczyszczeń, co potwierdza, że adaptacja do ścieków bezpośrednio wspiera wzrost mikroorganizmów w skali większej oraz zwiększa efektywność biodegradacji.

W kolejnym etapie przeprowadzono laboratoryjne badania biodegradacji MeP i TCC z wykorzystaniem zdefiniowanego konsorcjum bakteryjnego obejmującego *Alcaligenes* sp. oraz *Rhodococcus* sp. Eksperymenty prowadzono przy początkowym stężeniu 100 mg L⁻¹ przez okres 120 godzin w pożywce odżywczej oraz w syntetycznych ściekach. Do ilościowego monitorowania obu zanieczyszczeń zastosowano wysokosprawną chromatografię cienkowarstwową (HPTLC). Degradacja MeP osiągnęła około 89% w pożywce odżywczej oraz 83% w syntetycznych ściekach, przy czym w syntetycznych ściekach zaobserwowano intensyfikację degradacji w środkowej fazie procesu po adaptacji bakterii do matrycy ubogiej w składniki odżywcze. W przeciwieństwie do MeP, TCC wykazywał bardzo szybką degradację, przekraczając 97% usunięcia po 96 godzinach i ulegając całkowitemu zanikowi po 120 godzinach w obu mediach. Wyniki te dowodzą, że syntetyczne ścieki skutecznie wspierają wzrost bakterii oraz sprzyjają degradacji zarówno umiarkowanie, jak i silnie recalcitrantnych zanieczyszczeń bez konieczności zewnętrznego suplementowania składników odżywczych.

Etap skalowania przeprowadzono z wykorzystaniem laboratoryjnych biomimetycznych mokradel sztucznych obsadzonych *Phragmites australis*. Do matrycy mokradel wprowadzono układy grzybowe (*Trametes versicolor*), bakteryjne (*Pseudomonas aeruginosa*) oraz układ łączony, które eksploatowano i analizowano przez siedem tygodni w warunkach okresowych (batch), stosując syntetyczne ścieki zawierające mieszaninę zanieczyszczeń (kofeina, MeP i TCC po 100 mg L⁻¹). Wcześniejsze testy tolerancji potwierdziły zdolność mikroorganizmów do przetrwania w warunkach stresu wielozanieczyszczeniowego. Wszystkie biologicznie aktywne mokradła wykazywały stabilny wzrost roślin, utrzymanie pH w zakresie bliskim obojętnemu oraz trwałą aktywność mikrobiologiczną, co potwierdza skuteczną akumulację układu i stabilność ekologiczną.

Usuwanie zanieczyszczeń oceniano w 4. i 7. tygodniu przy użyciu spektroskopii ¹H i ¹³C NMR, tam gdzie było to analitycznie możliwe. Kofeina została całkowicie usunięta do 4. tygodnia w mokradłach bakteryjnych i konsorcjalnych oraz do 7. tygodnia w mokradle grzybowym. Metyloparaben ulegał degradacji w mokradle grzybowym na poziomie 89% w 4. tygodniu, natomiast całkowite usunięcie we wszystkich mokradłach osiągnięto do 7. tygodnia. Układ łączony grzybowo-bakteryjny nie wykazywał jednoznacznej przewagi nad monokulturami w początkowej fazie adaptacji, jednak skracał czas adaptacji, umożliwiał szybszą stabilizację systemu oraz zapewniał zrównoważoną skuteczność degradacji wobec chemicznie odmiennych zanieczyszczeń, co wskazuje na komplementarność funkcjonalną, a nie addytywną synergię. Układ ten poprawiał usuwanie metyloparabenu w porównaniu z samym systemem bakteryjnym, przy jednoczesnej porównywalnej skuteczności wobec kofeiny. Ze względu na ograniczenia rozpuszczalności TCC nie mógł być ilościowo oznaczony metodą NMR; jednak stabilna praca mokradel oraz wysoka skuteczność usuwania pozostałych zanieczyszczeń wskazują na sprzyjające warunki dla biodegradacji wybranych związków.

Podsumowując, niniejsze badania dowodzą, że celowana adaptacja mikroorganizmów do syntetycznych ścieków intensyfikuje degradację zanieczyszczeń poprzez umożliwienie wzrostu i aktywności metabolicznej przy wykorzystaniu składników odżywczych pochodzących ze ścieków. Łącząc optymalizację laboratoryjną z walidacją w skali pilotażowej w systemach mokradeł sztucznych, praca ta ustanawia skalowalną i zrównoważoną strategię aktywnej intensyfikacji mikrobiologicznego samooczyszczania, wykraczającą poza pasywną naturalną atenuację w zanieczyszczonych ekosystemach wodnych. Całościowo badania te redefiniują samooczyszczanie wód powierzchniowych jako proces celowo projektowany i biologicznie wzmacniany, a nie wyłącznie zjawisko naturalne.

Słowa kluczowe: zanieczyszczenia pojawiające się; syntetyczne ścieki; wzmocniona biodegradacja; adaptacja mikrobiologiczna; mokradła sztuczne; degradacja grzybowa; konsorcja bakteryjne; systemy samooczyszczania