

Justyna Michalska, Agnieszka Mroziak

## 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

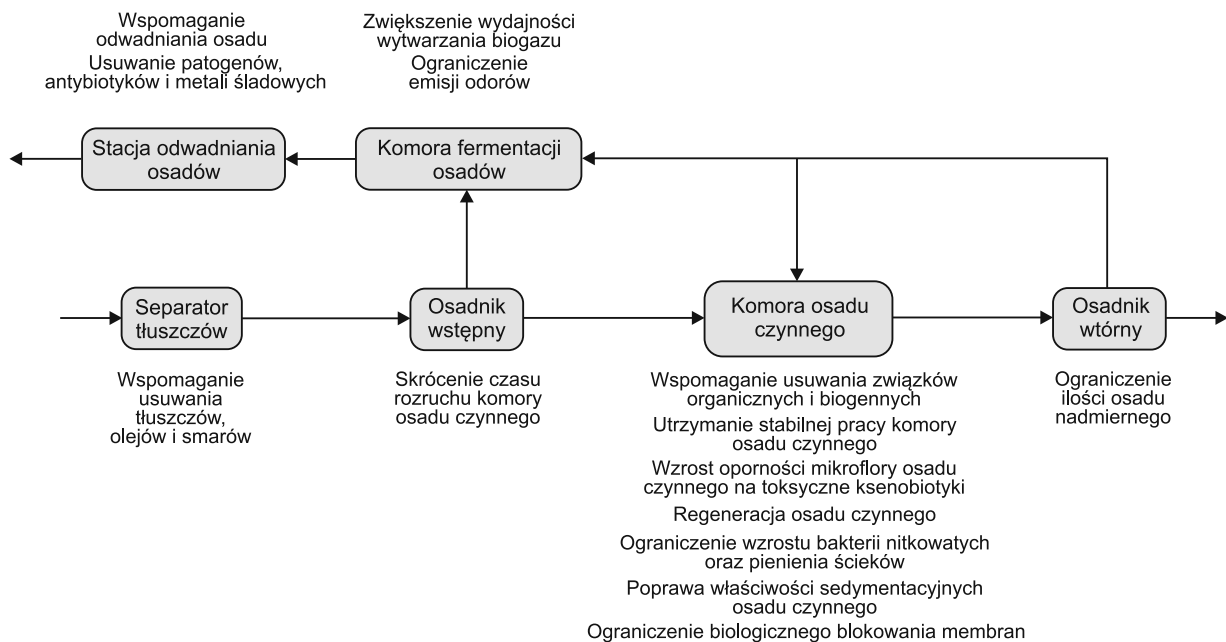
Atrakcyjnym rozwiązaniem problemów związanych z dużym ładunkiem zanieczyszczeń dopływających do oczyszczalni jest metoda bioaugmentacji. Polega ona na wprowadzeniu do osadu czynnego dodatkowej puli bakterii lub grzybów o znacznym potencjale degradacji konkretnych zanieczyszczeń, niewrażliwych na zmiany 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 wprowadzenie do innego osadu określane jest mianem bioaugmentacji allochtonicznej lub biowzbogacenia. 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 pomyślny 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/cm<sup>3</sup> do  $1,4 \cdot 10^3$  jtk/cm<sup>3</sup> w ciągu 36 d. Inokulowane bakterie początkowo pływały wolno wśród kłaczków osadu czynnego, natomiast wraz z upływem czasu coraz więcej identyfikowano ich wewnątrz wakuoli pierwotniaków. Przyczyną śmierci inokulantów mogły być brak zdolności konkurencji z rodzimą mikroflorą o związki odżywcze, obecność inhibitorów,

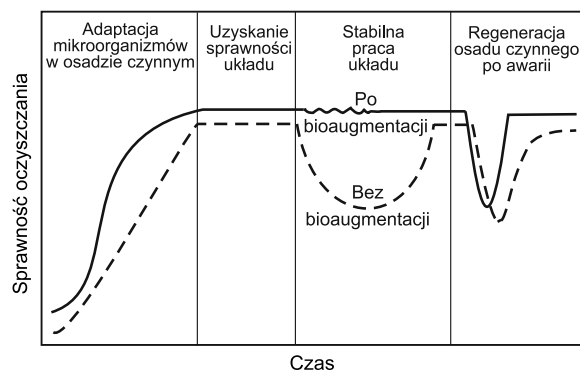


Rys. 1. Zastosowanie bioaugmentacji na różnych etapach biologicznego oczyszczania ścieków  
 Fig. 1. Application of bioaugmentation at various stages of biological wastewater treatment process

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<sup>3</sup> [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 konkurowania z innymi drobnoustrojami o związki odżywcze. Nośniki stosowane do immobilizacji mogą także zapewniać inokulantom ochronę przed drapieżnikami oraz zmniejszać 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 skutkowało skróceniem czasu rozruchu reaktora SBR do 1,5 d, usunięciem 90% początkowej ilości fenolu (550 mg/dm<sup>3</sup>) i spadkiem wartości pH z 10 do 8. Równocześnie w reaktorze niepoddanym 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/dm<sup>3</sup>) 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/dm<sup>3</sup>. 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, skutkowało 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 cm<sup>3</sup>/g w stosunku

do osadu kontrolnego (97 cm<sup>3</sup>/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, wynosiło 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/dm<sup>3</sup>), 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/dm<sup>3</sup> i 50 mg/dm<sup>3</sup>), 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/dm<sup>3</sup>) 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 <sup>3</sup>	z przemysłu farbiarskiego/ /komunalne (1/2, 1/1, 2/1)	Chiny – laboratorium	[39]
	chinolina – 316 mg/dm <sup>3</sup>			
<i>Paracoccus denitrificans</i> W12	pirydyna – 250÷500 mg/dm <sup>3</sup>	z przemysłu farmaceutycznego		[40]
<i>Pseudomonas</i> sp. HF-1	nikotyna – 40÷250 mg/dm <sup>3</sup>	z przemysłu tytoniowego/ /woda wodociągowa (7/100)		[41]
<i>Streptomyces</i> sp. QWE-35	naftalen – 38,2 mg/dm <sup>3</sup>	z gazyfikacji węgla		[42]
<i>Sphingobium</i> sp. BiD32	bisfenol A – 0,0017 mg/dm <sup>3</sup>	komunalne	Stany Zjednoczone – laboratorium	[43]
<i>Sphingopyxis</i> sp. TrD1				
<i>Rhodococcus</i> sp. p52 mający plazmidy pDF01 i pDF02 (geny kodujące dioksygenazę)	dibenzofuran – 300 mg/dm <sup>3</sup>	modelowe	Chiny – laboratorium	[44]
<i>Escherichia coli</i> JM109 (pGEX-AZR), mająca plazmid pGEX4T-1 (gen kodujący azoreduktazę)	Direct Blue – 71 mg/dm <sup>3</sup> , 150÷550 mg/dm <sup>3</sup>			[45]
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	fenol – 1800 mg/dm <sup>3</sup>			koksownicze
<i>Hansenula polymorpha</i>	formaldehyd, – 488 mg/dm <sup>3</sup> i 1128 mg/dm <sup>3</sup>	z przemysłu chemicznego	Polska – laboratorium	[47]
Konsorcjum <i>Cryptococcus humicolus</i> MCN2 i bakterii rozkładających cyjanki	cyjanek potasu – 25÷50 mg/dm <sup>3</sup>	modelowe	Korea – laboratorium	[48]
Konsorcjum <i>Achromobacter</i> sp. i <i>Flavobacterium breve</i> oraz innych nieoznaczonych bakterii	2,4-dichlorofenol – 50 mg/dm <sup>3</sup>		Chiny – laboratorium	[49]
<i>Rhodococcus</i> sp. YYL, <i>B. cereus</i> MLY1 i <i>B. aquimaris</i> MLY2	tetrahydrofuran – 1442 mg/dm <sup>3</sup>			[50]

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 donatorami 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, tracąc zdolności rozkładu lub transformacji toksycznych zanieczyszczeń i w konsekwencji zamierają. Pomyślnie zakończoną bioaugmentację osadu czynnego oczyszczającego ścieki z dibenzofuranem (DBF) w ilości 300 mg/dm<sup>3</sup>

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/dm<sup>3</sup> do 9 mgN/dm<sup>3</sup> oraz azotu amonowego z 13 mgN/dm<sup>3</sup> do 5 mgN/dm<sup>3</sup>. 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, anoksydacyjnych i tlenowych, co nie zawsze jest możliwe w konwencjonalnych systemach oczyszczania ścieków. Uzyskanie wysokiej sprawności usuwania substancji biogenych 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 drogich 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 mgPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/dm<sup>3</sup>) 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 BioAmp™, 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 mgO<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup> oraz zawartością kwasów tłuszczowych w ilości 117÷433 mg/dm<sup>3</sup>. Badania przeprowadzono w separatorach tłuszczu, będących elementem lokalnej oczyszczalni ścieków. Uzyskane wyniki wykazały, że zastosowanie systemu BioAmp™ było bardzo skuteczne, gdyż stężenie tłuszczów w ściekach zmniejszyło się z wartości początkowej 281 mg/dm<sup>3</sup> do 168 mg/dm<sup>3</sup>, 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 powstawania osadu nadmiernego. Ze względu na wymogi środowiskowe w zakresie zagospodarowania osadów, stale rosnące 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 niklu(II) i/lub cefaleksyny (antybiotyk) przeprowadzono bioaugmentację szczepem *Bacillus subtilis* 2012WTNC czterech rodzajów ścieków oczyszczonych – próbka kontrolna (E1) oraz ścieki zawierające odpowiednio jony niklu w ilości 10 mgNi/dm<sup>3</sup> (E2), cefaleksynę w ilości 1 g/dm<sup>3</sup> (E3) oraz oba zanieczyszczenia w tych samych ilościach (E4). Stwierdzono, że obecność tego szczepu spowodowała zmniejszenie zawartości jonów niklu 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 usuwania zawartych 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 wyłapują cząstki stałe 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 zawieszin 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<sup>7</sup> jtk/cm<sup>3</sup> do 10<sup>5</sup> jtk/cm<sup>3</sup> oraz z 10<sup>7</sup> jtk/cm<sup>3</sup> do 10<sup>3</sup> jtk/cm<sup>3</sup>.

### 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<sup>®</sup>, MicroChill<sup>™</sup> 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<sup>™</sup> Aqua, BioRemove<sup>™</sup> 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/BZT<sub>5</sub> 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<sup>™</sup> Pond Tablets oraz Eco Tabs<sup>™</sup> 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 przenosi 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*<sub>nagAC</sub> z genem dioksygenazy naftalenowej w celu produkcji indygo, z użyciem indolu jako induktora (73÷290 mg/dm<sup>3</sup>). W ciągu 132 d zaobserwowano gwałtowny wzrost zawartości błękitu indygowego w osadzie inokulowanym do 99,5 mg/dm<sup>3</sup>. W tym samym czasie ilość barwnika w osadzie kontrolnym oraz bioaugmentowanym szczepem *E. coli*<sub>nagAC</sub> wynosiła odpowiednio 19,2 mg/dm<sup>3</sup> oraz 27,3 mg/dm<sup>3</sup>. 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 inhibujące – quorum quenching) oraz rekombinowanym szczepem *Escherichia coli*<sub>aiiA</sub> 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*<sub>aiiA</sub> 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-RENTERIA: 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. MIÈGE, 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 (Kd) 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 *Micrococcus phosphovorans* 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. DYMACEWSKI [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* bdc06 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. DHOUIB, 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. CARÚCCI, 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: SSPRS 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. HAILI, L. LI, L. PING, L. HIU, L. GUOSHENG, Y. JIANMING: The acceleration of sludge granulation using the chlamydo spores 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.