



**POLITECHNIKA
RZESZOWSKA**
im. IGNACEGO ŁUKASIEWICZA

POLITECHNIKA RZESZOWSKA IM. IGNACEGO ŁUKASIEWICZA
DZIEDZINA NAUK INŻYNIERYJNO-TECHNICZNYCH
DYSCYPLINA INŻYNIERIA ŚRODOWISKA, GÓRNICCTWO I ENERGETYKA

ROZPRAWA DOKTORSKA

MOŻLIWOŚCI POPRAWY JAKOŚCI MIKROBIOLOGICZNEJ ŚCIEKÓW OCZYSZCZONYCH

mgr inż. Izabela Kiełb-Sotkiewicz

Promotor: dr hab. Justyna Zamorska, prof. PRz

Rzeszów 2024



**WYDZIAŁ
BUDOWNICTWA,
INŻYNIERII ŚRODOWISKA
I ARCHITEKTURY**
POLITECHNIKI RZESZOWSKIEJ



**SZKOŁA
DOKTORSKA**
POLITECHNIKI RZESZOWSKIEJ

Na powstanie i finalny kształt mojej rozprawy doktorskiej wpłynęło wiele osób, którym chciałabym wyrazić swoją wdzięczność.

Przede wszystkim, moje najgłębsze podziękowania kieruję do mojej Promotor, dr hab. Justyny Zamorskiej. Dziękuję za możliwość realizacji moich naukowych i zawodowych aspiracji, za poświęcony czas, cierpliwość, wsparcie oraz cenne wskazówki, które były nieocenione w trakcie pracy nad rozprawą.

Szczególne podziękowania należą się również wszystkim, którzy w znaczący sposób przyczynili się do powstania tej pracy. W szczególności dziękuję moim Koleżankom i Koledze z Zakładu Oczyszczania i Ochrony Wód za życzliwość i wszelką pomoc.

Nie mogę zapomnieć o mojej rodzinie i przyjaciółach, którzy wspierali mnie na każdym etapie tej drogi. Wasza obecność, wsparcie i motywacja były dla mnie nieocenione.

Spis treści

I.	Część teoretyczna	9
1.	Wprowadzenie i uzasadnienie podjęcia tematu.....	9
2.	Teza, cel i zakres pracy	16
2.1.	Teza i cel pracy.....	16
2.2.	Problem badawczy:	17
2.3.	Zakres pracy	18
3.	Obowiązujące w Polsce i za granicą regulacje prawne dotyczące oczyszczania i dezynfekcji ścieków	20
4.	Dezynfekcja ścieków i ich ponowne wykorzystanie – praktyki stosowane w kraju i na świecie.....	24
4.1.	Dezynfekcja ścieków w kraju i na świecie.....	24
4.2.	Ponowne wykorzystanie ścieków oczyszczonych.....	25
5.	Zagrożenia mikrobiologiczne odpływów z oczyszczalni ścieków	30
5.1.	Ścieki i ich oczyszczanie	30
5.2.	Charakterystyka mikroorganizmów w ściekach.....	38
5.2.1.	Wirusy	38
5.2.2.	Bakterie	41
5.2.3.	Pierwotniaki pasożytnicze	46
5.2.4.	Pasożyty jelitowe.....	47
5.2.5.	Grzyby	48
6.	Możliwości poprawy jakości mikrobiologicznej ścieków w celu ich ponownego wykorzystania – dezynfekcja i higienizacja (metody biologiczne, fizyczne, chemiczne i łączone).....	50
6.1.	Biologiczne metody higienizacji ścieków – biopreparaty	50
6.2.	Fizyczne metody dezynfekcji ścieków – promieniowanie ultrafioletowe UV	57
6.3.	Chemiczne metody dezynfekcji ścieków – ozonowanie	61
7.	Metody oznaczania mikroorganizmów	66
7.1.	Oznaczenia mikrobiologiczne metodami hodowlanymi	66
7.2.	Szybkie metody oznaczania mikroorganizmów	67
7.2.1.	Luminometria ATP.....	67
7.2.2.	Cytometria przepływowa FCM	68
7.3.	Metody molekularne – PCR.....	74
II.	Część doświadczalna	77
1.	Przedmiot badań.....	77
1.1.	Oczyszczalnia ścieków w Tarnobrzegu.....	77
1.2.	Oczyszczalnia ścieków w Rzeszowie.....	78

2.	Metodyka badań	81
2.1.	Materiał i jego przygotowanie.....	81
2.2.	Przebieg eksperymentu.....	82
2.2.1.	Metodyka badania wpływu biopreparatów na jakość mikrobiologiczną ścieków oczyszczonych	82
2.2.2.	Metodyka badania działania promieniowania ultrafioletowego UV w dezynfekcji ścieków oczyszczonych	85
2.2.3.	Metodyka badania skuteczności działania ozonu w dezynfekcji ścieków oczyszczonych	87
2.2.4.	Ocena stabilności mikrobiologicznej ścieków po przeprowadzonych procesach dezynfekcji.....	88
2.2.5.	Ocena wpływu biopreparatów na jakość mikrobiologiczną ścieków po procesach dezynfekcji.....	89
2.3.	Metodyka oznaczeń.....	91
2.3.1.	Wskaźniki fizykochemiczne.....	91
2.3.2.	Wskaźniki mikrobiologiczne.....	92
3.	Wyniki badań i ich omówienie.....	96
3.1.	Parametry fizykochemiczne ścieków oczyszczonych	96
3.2.	Wykorzystanie biopreparatów w higienizacji ścieków oczyszczonych	96
3.2.1.	Wpływ dawki zastosowanego biopreparatu na skuteczność usuwania bakterii z grupy <i>coli</i> ze ścieków oczyszczonych.....	96
3.2.2.	Wpływ czasu działania biopreparatu na skuteczność usuwania bakterii z grupy <i>coli</i> ze ścieków oczyszczonych	100
3.2.3.	Wpływ dodatkowego natleniania na skuteczność usuwania bakterii z grupy <i>coli</i> ze ścieków oczyszczonych	102
3.2.4.	Wpływ formy biopreparatu na skuteczność usuwania bakterii z grupy <i>coli</i> ze ścieków oczyszczonych	104
3.2.5.	Wpływ podłoża biopreparatu na skuteczność usuwania bakterii z grupy <i>coli</i> ze ścieków oczyszczonych	106
3.2.6.	Wpływ mikroorganizmów oddzielonych od podłoża na skuteczność usuwania bakterii z grupy <i>coli</i> ze ścieków oczyszczonych	109
3.2.7.	Wyniki badań liczebności paciorkowców kałowych.....	114
3.2.8.	Analizy molekularne PCR.....	116
3.2.9.	Wyniki zmian parametrów fizykochemicznych	117
3.2.10.	Dyskusja	118
3.3.	Wykorzystanie promieniowania ultrafioletowego UV w dezynfekcji ścieków oczyszczonych.....	126
3.3.1.	Określenie skuteczności zastosowanych dawek promieniowania	126

3.3.2.	Wyniki badań stabilności mikrobiologicznej po procesie dezynfekcji promieniowaniem UV	128
3.3.3.	Określenie wpływu biopreparatów na jakość mikrobiologiczną ścieków po procesach dezynfekcji promieniowaniem UV	131
3.3.4.	Dyskusja	136
3.4.	Wykorzystanie ozonowania w dezynfekcji ścieków oczyszczonych	141
3.4.1.	Określenie skuteczności zastosowanych dawek ozonu	141
3.4.2.	Wyniki badań stabilności mikrobiologicznej ścieków po procesie dezynfekcji ozonem	146
3.4.3.	Określenie wpływu biopreparatu A7 na jakość mikrobiologiczną ścieków po procesach dezynfekcji ozonem	154
3.4.4.	Wpływ ozonu na barwę ścieków	164
3.4.5.	Dyskusja	165
4.	Podsumowanie, wnioski i kierunki dalszych badań	170
4.1.	Podsumowanie.....	170
4.2.	Wnioski	173
4.3.	Kierunki dalszych badań	175
5.	Spis wykresów.....	177
6.	Spis rysunków	180
7.	Spis tabel	180
8.	Załączniki	182
9.	Abstract	261
10.	Literatura	263

Wykaz najważniejszych definicji

Sterylizacja ścieków oczyszczonych – proces eliminacji wszelkich form mikroorganizmów (zarówno wegetatywnych, jak i przetrwalnikowych), bakterii, wirusów i innych patogenów z wody oczyszczonej.

Dezynfekcja ścieków oczyszczonych (odkażanie) – proces niszczenia (redukcji lub eliminacji) drobnoustrojów, zwłaszcza chorobotwórczych (bakterii wegetatywnych, wirusów i innych patogenów), do poziomów, które nie stanowią zagrożenia dla zdrowia publicznego. Przebiega z wykorzystaniem metod zarówno fizycznych, chemicznych, jak i biologicznych.

Higienizacja ścieków oczyszczonych – w pracy oznacza proces poprawy jakości mikrobiologicznej, w tym redukcję liczebności organizmów, które mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia.

Sterylizacja ma na celu eliminację wszelkich form życia mikrobiologicznego, dezynfekcja skupia się na redukcji liczby patogenów do bezpiecznych poziomów, higienizacja obejmuje zaś szeroki zakres działań mających na celu poprawę jakości mikrobiologicznej rozumianej głównie jako redukcja liczebności organizmów będących wskaźnikami stanu sanitarnego ścieków oczyszczonych.

I. Część teoretyczna

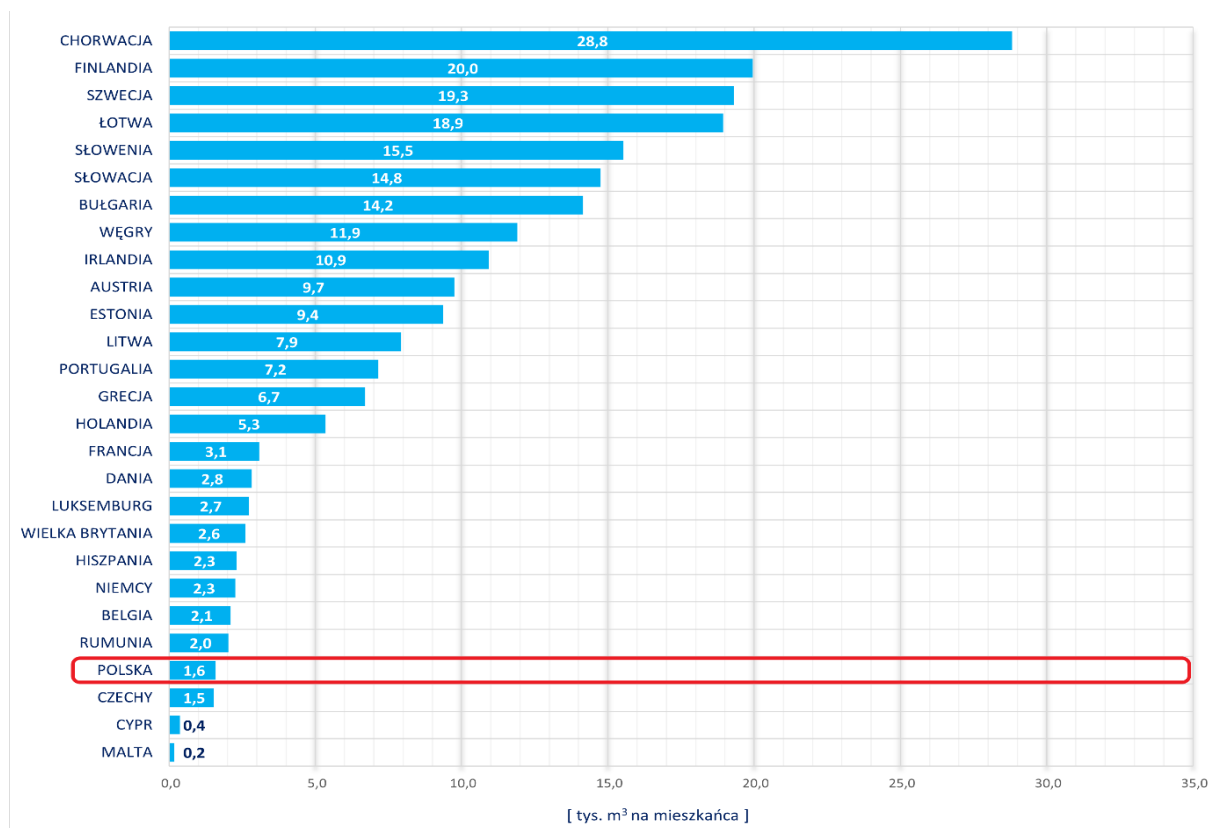
1. Wprowadzenie i uzasadnienie podjęcia tematu

Jednym z kluczowych problemów, które wymagają pilnych działań, jest pogłębiający się deficyt wody na świecie. Dlatego współczesne społeczeństwa stoją przed ogromnym wyzwaniem związanym z racjonalnym zarządzaniem zasobami wodnymi. Postępujące zmiany klimatyczne, zjawiska ekstremalne, w tym coraz dłuższe i dotkliwiej odczuwalne susze, ekstensywna produkcja i gospodarka rolna, ekspansja obszarów zurbanizowanych oraz rosnące potrzeby ludności sprawiają, że dostęp do czystej wody staje się coraz bardziej utrudniony. Z tą niebezpieczną tendencją od kilku dekad stara się walczyć cały świat, w tym również Unia Europejska [1].

Już jedna trzecia terytorium UE zmaga się z problemem deficytu wodnego w okresie całego roku, a w coraz większej liczbie państw odnotowuje się sezonowe niedostatki słodkiej wody oraz pogorszenie jej jakości [2]. Według prognoz dotyczących zmian klimatu problem ten będzie się pogłębiał w kolejnych dziesięcioleciach [3]. Zgodnie z Raportem Najwyższej Izby Kontroli (NIK) [4] największymi zasobami wód powierzchniowych i podziemnych w Europie dysponuje Norwegia (371 mld m³), Szwecja (196,5 mld m³) i Francja (191 mld m³). Zasoby wodne Polski kształtują się na poziomie ok. 60 mld m³ (dla pory suchej przyjmuje się wartość 40 mld m³), co w przeliczeniu na jednego mieszkańca daje 1,6 dam³ rocznie, przy średniej europejskiej wynoszącej około 5 dam³ na mieszkańca /rok. Nie dziwi zatem, że Polska, ze względu na zasoby wodne uważana jest za kraj ubogi i bezpośrednio dotknięty zagrożeniami związanymi z deficytem wodnym (rys.1) [5]. Należy pamiętać, że ograniczony dostęp do słodkiej wody ma niekorzystny wpływ zarówno na sytuację mieszkańców jako jednostek, jak i różnych sektorów gospodarki. Cykliczne deficyty wody uniemożliwiają normalny rozwój społeczeństw, przez co wpływają na zmianę dotychczasowego stylu życia i/lub migrację [6].

Woda słodka, obejmująca jeziora, rzeki, wody podziemne i lód, stanowi jedynie 3,5% światowych zasobów (96,5% to woda słona). W Europie prawie 88% zużywanej do różnych celów (w tym rolniczych i przemysłowych) wody słodkiej pochodzi z rzek i wód podziemnych, z niewielkim udziałem sztucznych zbiorników (około 10%) i jezior (poniżej 2%). Podobnie jak inne ważne zasoby czy formy życia, woda jest narażona na presję, zwłaszcza gdy popyt na nią przewyższa dostępność lub gdy jej jakość jest obniżana przez różnego rodzaju zanieczyszczenia. Głównym źródłem tych ostatnich są emisje przemysłowe, oczyszczalnie ścieków, transport, rolnictwo, leśnictwo i gospodarstwa domowe na obszarach wiejskich. Według najnowszych danych Europejskiej Agencji Środowiska (EEA) tylko 44% wód

powierzchniowych w Europie osiąga dobry lub bardzo dobry stan ekologiczny. Stan wód podziemnych jest nieco lepszy, gdyż około 75% charakteryzuje się dobrym stanem chemicznym. Raport EEA określa stan mórz w Europie jako zły [7].



Rysunek 1. Zasoby wodne w Europie (stan na 2021r.) przypadające na jednego mieszkańca
źródło: GUS [8]

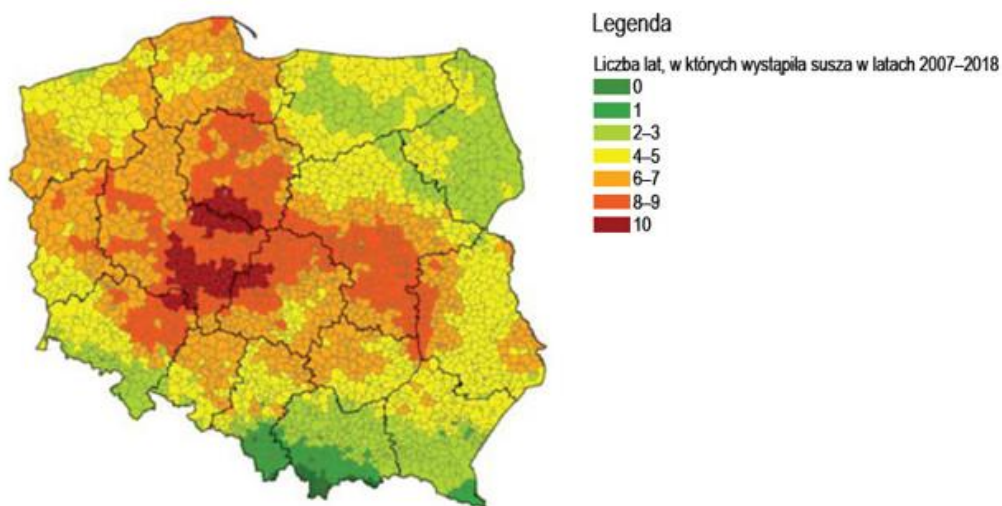
Prognozy z ubiegłych lat wskazywały, że już w 2025 roku aż 60% światowej populacji może cierpieć z powodu fizycznego niedoboru wody [9,10]. Zgodnie z ustaleniami ONZ dwa miliardy ludzi nie mają już dziś dostępu do bezpiecznej wody pitnej, a 3,6 miliarda nie ma dostępu do bezpiecznych urządzeń sanitarnych. Według raportu o wodzie na rok 2023 [11] przygotowanego przez organizację naukową Narodów Zjednoczonych UNESCO brakiem wody przez co najmniej miesiąc w roku mogą być dotknięte nawet trzy miliardy ludzi, a za około 30 lat to zjawisko może już dotyczyć nawet 5,7 miliarda mieszkańców Ziemi [12].

Ponowne wykorzystanie ścieków staje się zatem jedną z głównych opcji rozważanych jako nowe źródło wody przede wszystkim w regionach zagrożonych deficytem wodnym, takich jak Bliski Wschód. W krajach o klimacie suchym i półsuchym ponowne wykorzystanie oczyszczonych ścieków traktowane jest jako integralna część dostępnych zasobów wody [13,14]. Wnioski z badań Maha Elshafai i in.[15] udowadniają, że system zintegrowanego, przydomowego oczyszczania może skutecznie oczyszczać ścieki bytowe o stężeniu

zanieczyszczeń niskim lub średnim, które spełniają normy Kodeksu Praktyki Egiptu (ECP 501-2015) dotyczące ich ponownego użycia w celach nawadniania, również w kontekście usuwania patogenów, takich jak np. bakterie kałowe, w tym *E.coli*.

Ograniczony dostęp do wody wpływa także niekorzystnie na sytuacje różnych sektorów gospodarki (co bezpośrednio rzutuje na konkurencyjność i rynki wewnętrzne). Do najbardziej dotkniętych tym deficytem należy zaliczyć rolnictwo, turystykę, przemysł, energetykę i transport [3]. Rolnictwo odpowiada za zużycie największej ilości słodkiej wody. Podaje się, że około 70% światowych zasobów wodnych wykorzystuje się do nawadniania w tym sektorze gospodarki [5]. Ze względu na ograniczone zasoby wodne i olbrzymie potrzeby już dziś, na całym świecie, do nawadniania w rolnictwie zużywa się około 4,5 mln ha ścieków oczyszczonych [16]. Inne szacunki sugerują, że około 200 milionów rolników stosuje alternatywną metodę nawadniania, wykorzystując w tym celu ścieki oczyszczone (niekiedy nieoczyszczone) na około 20 milionach ha [17,18,10].

W przypadku Polski niemal 40% obszarów klasyfikowanych jako rolne i leśne uznaje się za bardzo poważnie zagrożone suszą rolniczą, która uchodzi za narastający problem. W poprzednich dziesięcioleciach występowała ona w stałych, około pięcioletnich odstępach czasu. Najnowsze dane pokazują jednak, że w ostatnich latach poszczególne regiony Polski zmagają się z nią każdego roku, przy czym problem ten dotyczy coraz większego obszaru naszego kraju (rys.2).



Rysunek 2. Gminy, w których wystąpiła susza rolnicza w latach 2007–2018, źródło: ekspertyza IUNG-PIB [19]

Pomimo faktu, że Polska leży w strefie umiarkowanych opadów, posiada niewielkie zasoby wody. Na realne zagrożenie deficytem wody w rolnictwie ma wpływ zarówno fakt, że woda rozmieszczona jest nierównomiernie, jak również to, że nie jest dostępna w wystarczającej ilości każdego roku (w ilości optymalnej dla produkcji rolnej). Prognozy pokazują, że w kolejnych latach ryzyko suszy rolniczej będzie wzrastać, co przełoży się na wysychanie gleb i realne trudności z utrzymaniem produkcji rolnej na obecnym poziomie. Już dziś około trzy czwarte powierzchni Polski doświadcza regularnych niedoborów wody. Prognozy wskazują, że problem ten będzie najbardziej odczuwalny w zachodniej i centralnej Polsce, przede wszystkim w województwach wielkopolskim i kujawsko-pomorskim [5].

Badania nad wpływem oczyszczonych ścieków na jakość wód w odbiorniku, takie jak przeprowadzone przez J. Zamorską i A. Piecha [20] z Politechniki Rzeszowskiej, otwierają ważny rozdział w rozumieniu ekologicznych skutków procesów oczyszczania ścieków. Autorzy podkreślają, że skuteczność procesów oczyszczania ścieków nie zawsze gwarantuje optymalną jakość wód w odbiorniku. Woda odprowadzana ze stacji oczyszczania może nadal zawierać różnego rodzaju substancje, które mogą wpływać negatywnie na ekosystem wodny i zdrowie publiczne. Badania wskazują na potrzebę ciągłego doskonalenia technologii oczyszczania ścieków, z uwzględnieniem rosnących wyzwań związanych z substancjami farmaceutycznymi, mikroplastikiem i innymi zanieczyszczeniami, które trafiają do środowiska wodnego. Przesuwanie granic efektywności oczyszczania staje się kluczowym elementem ochrony ekosystemów wodnych. Dodatkowo brak obowiązkowego monitoringu jakości mikrobiologicznej odprowadzanych ścieków sprawia, że ich ponowne wykorzystanie może być utrudnione. Nadzwyczaj ważnym elementem w związku z zagrożeniem niedoborem wody oraz niską jakością wód powierzchniowych (odbiorników ścieków oczyszczonych) jest osiągnięcie tak wysokiej jakości oczyszczonych ścieków, aby mogły być one bezpiecznie wprowadzone z powrotem do obiegu wodnego. Istotne jest, aby nie przyczyniały się do pogorszenia jakości wód w odbiornikach. W tym kontekście kluczowe staje się osiągnięcie takiej jakości oczyszczania, która minimalizuje negatywne wpływy na środowisko wodne, jednocześnie umożliwiając ponowne wykorzystanie wody w zrównoważony i bezpieczny sposób. Realizacja tego celu przyczynia się do tworzenia zamkniętego obiegu wody, gdzie oczyszczone ścieki stają się zdadne do ponownego wykorzystania. Ostatecznym celem jest minimalizacja strat wody i ograniczenie negatywnego wpływu na naturalne ekosystemy wodne. W ten sposób oprócz aspektów ekologicznych uwzględnia się również istotne kwestie ekonomiczne i społeczne związane z efektywnym gospodarowaniem zasobami wodnymi.

Należy pamiętać, że około 60% dorzeczy w UE znajduje się na terytorium różnych krajów unijnych. Konieczne jest zatem, aby problemy związane z gospodarką wodną i zanieczyszczeniem wód rozwiązywane były na poziomie całej Unii Europejskiej, m.in. w celu uniknięcia wzajemnie wykluczających się przepisów krajowych [3]. W tym kontekście jakość mikrobiologiczna ścieków oczyszczonych staje się przedmiotem zainteresowania osób i instytucji, dążących do jednoczesnego zaspokojenia potrzeb w zakresie ochrony środowiska wodnego jak i efektywnego wykorzystania zasobów wodnych. W ramach holistycznego podejścia do gospodarki wodnej, które obejmuje środki ochrony wody oraz efektywne gospodarowanie nią, oczyszczone ścieki z miejskich oczyszczalni stanowią niezbędną alternatywę dla różnego rodzaju celów, w tym nawadniania w rolnictwie czy uzupełniania warstwy wodonośnej, mogą być także przydatne w przemyśle. Obecnie ponowne wykorzystanie wody ma ogromny potencjał, który pozostaje w dużej mierze niespożytkowany w Europie [21]. Tymczasem zdolność Unii do reagowania na rosnącą presję rozwiązania problemu związanego z deficytem wodnym może się przejawiać m.in. poprzez:

- promowanie ponownego wykorzystania oczyszczonych ścieków;
- nałożenie ograniczeń w wykorzystywaniu jednolitych części wód powierzchniowych i podziemnych;
- ograniczenie niekorzystnego wpływu ścieków odprowadzanych do wód powierzchniowych, przy zapewnieniu wysokiego poziomu ochrony środowiska.

Ponowne wykorzystanie odzyskanej wody jest zgodne z promowaną przez UE koncepcją gospodarek o obiegu zamkniętym, uwzględniającą m.in. przywracanie z powrotem do obiegu składników odżywczych, takich jak azot, fosfor i potas. W ten sposób recykling wody może prowadzić do zmniejszenia zapotrzebowania np. na dodatkowe nawozy.

Uważa się, że ponowne użytkowanie odpowiednio oczyszczonych ścieków, pochodzących na przykład z komunalnych oczyszczalni ścieków, ma mniejszy wpływ na środowisko niż inne alternatywne źródła zaopatrzenia w wodę, takie jak transfery wody lub odsalanie. Obecnie ponowne wykorzystanie uzdatnionej wody stosowane jest jednak w krajach Unii Europejskiej jedynie w ograniczonym zakresie. Wydaje się to spowodowane głównie znacznymi kosztami systemów ponownego wykorzystania ścieków oraz brakiem wspólnych, unijnych norm środowiskowych i zdrowotnych dotyczących używania ścieków w rolnictwie. Mowa tu zwłaszcza o wprowadzeniu na rynek bezpiecznych produktów rolnych, wolnych od potencjalnych zagrożeń dla zdrowia ludzkiego i środowiska naturalnego.

Spełnienie minimalnych wymogów dotyczących ponownego wykorzystania wody musi być zgodne z polityką wodną Unii Europejskiej i przyczyniać się do realizacji Agendy ONZ na rzecz zrównoważonego rozwoju do 2030r., a zwłaszcza do osiągnięcia celu 6, jakim jest zapewnienie wszystkim ludziom dostępu do wody i odpowiednich warunków sanitarnych poprzez zrównoważone gospodarowanie zasobami wody. Ponadto unijne uregulowania prawne muszą być zgodne z art. 37 Karty praw podstawowych Unii Europejskiej dotyczącym ochrony środowiska – wysoki poziom ochrony środowiska i poprawa jego jakości muszą być zintegrowane z politykami krajów Unii i zapewnione zgodnie z zasadą zrównoważonego rozwoju [22,2].

W tym kontekście zastosowanie biopreparatów jako środka ekologicznego zyskuje na znaczeniu. Ich potencjał, który można spożytkować dla poprawienia jakości mikrobiologicznej ścieków oczyszczonych oraz dodatni wpływ na procesy rekultywacji wód są tematami, które zasługują na szczególną uwagę. Badania naukowców zajmujących się tym zagadnieniem wskazują na korzyści z zastosowania biopreparatów w rekultywacji wód powierzchniowych, procesach oczyszczania ścieków, a także sugerują możliwość ich wykorzystania w kontekście ponownego zagospodarowania ścieków. Prace nad mikrobiologiczną rekultywacją zanieczyszczonego zbiornika wodnego „Słoneczko” autorstwa J. Mazurkiewicza i zespołu [23] czy badania nad biologicznymi metodami oczyszczania wód, takie jak te prowadzone przez J. Zamorską i I. Kiełb-Sotkiewicz [24] w kontekście biologicznego sposobu oczyszczania wód powierzchniowych zanieczyszczonych odciekami przemysłowymi, ukazują złożoność i aktualność tego zagadnienia oraz otwierają nowe perspektywy w poszukiwaniu skutecznych rozwiązań. Warto zauważyć, że wymagania dotyczące jakości mikrobiologicznej wód stają się coraz bardziej rygorystyczne, co niesie za sobą potrzebę skutecznych metod poprawy jakości oczyszczonych ścieków. Artykuły naukowe oraz stosowana w komunalnych oczyszczalniach ścieków praktyka wskazują na skuteczność wykorzystywania biopreparatów w procesach oczyszczania ścieków, m.in. w usuwaniu związków biogenych: azotu i fosforu, biodegradacji substancji organicznych, usprawnieniu procesów beztlenowych, eliminacji nieprzyjemnych zapachów (odorów), poprawie jakości osadu czynnego czy zmniejszeniu ilości osadów wymagających usunięcia.

Zastosowanie biopreparatów może przyczynić się nie tylko do skuteczniejszego usuwania zanieczyszczeń mikrobiologicznych (eliminacji patogenów) w procesach biologicznego oczyszczania ścieków – higienizacji ścieków oczyszczonych – ale także do odbudowy zdrowej mikroflory wodnej wód odbiornika (poprawa jakości wód powierzchniowych), co bezpośrednio przełoży się na realizację idei obiegu zamkniętego i wzrostu potencjału

ponownego wykorzystania ścieków w cyklu. W związku z powyższym uzasadnione jest podjęcie tematyki obejmującej ww. zagadnienia jako tematu rozprawy doktorskiej.

2. Teza, cel i zakres pracy

2.1. Teza i cel pracy

Teza główna:

Możliwa jest higienizacja ścieków bytowych pochodzących z miejskich, komunalnych oczyszczalni. Proces higienizacji jest rozumiany jako poprawa jakości mikrobiologicznej ścieków oczyszczonych, czyli redukcja liczebności organizmów wskaźnikowych, co bezpośrednio przekłada się na redukcję liczebności mikroorganizmów patogennych.

Dodatkowe tezy badawcze:

- możliwe jest złagodzenie negatywnego wpływu odprowadzanych ścieków oczyszczonych na jakość wód odbiornika;
- możliwe jest wydłużenie czasu skuteczności działania zastosowanych procesów dezynfekcji/higienizacji;
- możliwy jest wzrost potencjału ponownego wykorzystania ścieków poprzez wykorzystanie klasycznych metod dezynfekcji ścieków, takich jak ozonowanie i promieniowanie ultrafioletowe, metod biologicznych – biopreparatów, oraz metod stanowiących połączenie dwóch powyższych;
- możliwe jest wykorzystanie szybkich metod oznaczania mikroorganizmów (luminometria, cytometria przepływowa) w celu ustalania dawki stosowanego dezynfektanta, co ma kluczowe znaczenie w szybkim reagowaniu na zmieniające się parametry jakości ścieków oczyszczonych i przekłada się na zwiększenie bezpieczeństwa sanitarnego wód odbiornika.

Cel główny:

Głównym celem pracy było wykazanie, że stosowane metody dezynfekcji ścieków oczyszczonych w połączeniu z działaniem biopreparatów mogą stanowić naturalną, bezpieczną i przede wszystkim skuteczną metodę poprawy jakości mikrobiologicznej ścieków oczyszczonych. Celem poprawy jakości mikrobiologicznej ścieków oczyszczonych była – w przypadku odprowadzania oczyszczonych ścieków do odbiornika – poprawa jakości mikrobiologicznej wód odbiornika, natomiast w przypadku ścieków przeznaczonych do ponownego wykorzystania np. w rolnictwie, w przemyśle, w usługach komunalnych lub w innych celach dotyczących ochrony środowiska, zapewnienie jakości ścieków

odpowiadającej obowiązującym na terenie Unii Europejskiej przepisom, a tym samym zapewnienie bezpieczeństwa sanitarnego mieszkańcom.

Cele szczegółowe:

- określenie skuteczności działania biopreparatów w poprawie jakości mikrobiologicznej ścieków oczyszczonych;
- określenie efektywności dezynfekcji ścieków z zastosowaniem promieniowania UV i badanie stabilności mikrobiologicznej po tym procesie;
- określenie efektywności ozonowania i stabilności mikrobiologicznej ścieków po procesie ozonowania.

Holistycznym celem pracy był wkład w rozwój zrównoważonych praktyk gospodarki wodnej obiegu zamkniętego, przyczyniających się do rozwiązania globalnych problemów związanych z deficytem wodnym, powszechnym dostępem do czystej wody oraz złym stanem wód powierzchniowych.

2.2. Problem badawczy:

- Już jedna trzecia terytorium UE zmagą się z problemem deficytu wodnego w okresie całego roku, a w coraz większej liczbie państw odnotowuje się sezonowe niedostatki słodkiej wody oraz pogorszenie jej jakości;
- Tylko 44% wód powierzchniowych w Europie osiąga dobry lub bardzo dobry stan ekologiczny; odbiornikami ścieków oczyszczonych są przede wszystkim wody powierzchniowe, głównie rzeki;
- Zalecenia prawne, dotyczące wymogów jakości ścieków odprowadzanych z oczyszczalni ścieków do odbiorników, dotyczą przede wszystkim parametrów fizykochemicznych, w tym m.in. zawartości biogenów (azotu i fosforu), ilości zawartej w ściekach zawiesiny, wysokości wskaźników charakteryzujących BZT₅ czy ChZT; zachowanie odpowiednich standardów mikrobiologicznych, nie jest monitorowane, ponieważ nie jest obowiązkowe na świecie, w tym również w Polsce;
- Zanieczyszczenia mikrobiologiczne obecne w oczyszczonych ściekach, pomimo bardzo wysokiego stopnia redukcji, nadal mogą stwarzać znaczące zagrożenie dla jakości wód w odbiornikach tych ścieków, a ponadto stanowią one:
 - bezpośrednie zagrożenie epidemiologiczne;

- mogą wywoływać reakcje alergiczne;
- działać toksycznie na człowieka, zwierzęta lub środowisko.
- Dezynfekcja ścieków w Polsce nie jest powszechnie stosowana, ponieważ nie jest obowiązkowa (z wyjątkami wskazanymi w Ustawie z dnia 7 czerwca 2001 r. o zbiorowym zaopatrzeniu w wodę i zbiorowym odprowadzaniu ścieków) [36];
- Stabilność mikrobiologiczna ścieków oczyszczonych po procesie dezynfekcji nie jest do końca znana. W literaturze pojawiają się tylko doniesienia o stabilności mikrobiologicznej wody przeznaczonej do spożycia. Należy jednak pamiętać, że brak stabilności biologicznej odprowadzanych ścieków oczyszczonych również warunkuje wtórny rozwój mikroorganizmów i związane z tym zagrożenia;

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2020/741 z dnia 25 maja 2020 r. w sprawie minimalnych wymogów dotyczących ponownego wykorzystania wody (wejście w życie: 26 czerwca 2023r.) określa wymogi dotyczące jakości odzyskanej wody dla czterech klas, w zależności od jej późniejszego wykorzystania (cele rolnicze, przemysłowe, środowiskowe), które obejmują parametry fizykochemiczne: BZT₅, zawiesinę ogólną. Uwzględniono również parametry mikrobiologiczne – *E.coli* oraz inne, w tym *Legionella spp.*, czy nicienie jelitowe.

2.3. Zakres pracy

Praca składa się z dwóch zasadniczych części – literaturowej i badawczej. W pierwszej części literaturowej przedstawiono:

- obowiązujące w Polsce i za granicą regulacje prawne dotyczące oczyszczania i dezynfekcji ścieków;
- stosowane w kraju i na świecie praktyki dotyczące dezynfekcji ścieków i ich ponownego wykorzystania;
- zagrożenia mikrobiologiczne odpływów z oczyszczalni ścieków;
- możliwości poprawy jakości mikrobiologicznej ścieków w celu ich ponownego wykorzystania;
- metody oznaczania mikroorganizmów.

W drugiej części, w celu osiągnięcia założonych celów oraz udowodnienia postawionych tez zrealizowano następujące zadania:

- przebadano możliwości wykorzystania biopreparatów w celu higienizacji ścieków oczyszczonych;
- przebadano skuteczność dezynfekcji z zastosowaniem promieniowania UV i ozonowania oraz stabilność mikrobiologiczną ścieków po procesie dezynfekcji;
- przebadano możliwości wykorzystania metod łączonych: biopreparatów w połączeniu z promieniowaniem UV oraz z ozonowaniem w celu eliminacji patogenów, wydłużenia czasu skutecznej dezynfekcji oraz wzbogacenia ścieków w mikroorganizmy, mające wpłynąć na poprawę jakości mikrobiologicznej odzyskanej wody.

W pracy do oznaczeń mikrobiologicznych wykorzystano zarówno tradycyjne metody hodowlane, jak i nowoczesne techniki szybkiego oznaczania, takie jak cytometria przepływowa (FCM), reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) oraz luminometria (ATP).

3. Obowiązujące w Polsce i za granicą regulacje prawne dotyczące oczyszczania i dezynfekcji ścieków

Oczyszczanie ścieków stanowi kluczowy element praktyki eksploatacyjnej w gospodarce wodno-ściekowej, obejmujący szeroki zakres działań mających na celu utrzymanie bezpieczeństwa środowiska naturalnego i ochronę zdrowia publicznego. Od chwili utworzenia Unii Europejskiej kwestie związane z ochroną środowiska, zwłaszcza dotyczące wody (zarówno jej jakości, jak i ilości), podlegają dokładnemu uregulowaniu wspólnotowemu. Szczegółowe postanowienia dotyczące standaryzacji działań w tym obszarze są zawarte w dyrektywach skierowanych do wszystkich państw członkowskich i zobowiązujących do osiągnięcia określonych celów w ściśle określonym czasie. Do dziś przyjęto kilkanaście aktów prawnych, w tym kilka dyrektyw, regulujących kwestie jakości wód rzecznych oraz wody pitnej – tzw. normy czystości [25].

W Europie wdrożono wiele dyrektyw dotyczących jakości wody i oczyszczania ścieków, takich jak: 75/440/EWG, 76/160/EWG, 78/659/EWG, 79/923/EWG i 98/83/WE. W celu zapewnienia jakości oczyszczonych ścieków stosuje się także dyrektywy 76/464/EWG, 91/271/EWG i 91/676/EWG. Przepisy prawne Unii Europejskiej w zakresie odprowadzania i oczyszczania ścieków komunalnych są szczegółowo określone, zwłaszcza przez Dyrektywę Rady UE z dnia 21 maja 1991 r. (91/271/EWG) dotyczącą oczyszczania ścieków komunalnych, będącą kluczowym aktem prawnym w obszarze „Jakości wód” [26]. Reguluje ona zbieranie, oczyszczanie i odprowadzanie ścieków komunalnych oraz oczyszczanie i odprowadzanie ścieków z przemysłu rolno-spożywczego. Głównym celem przepisów jest ochrona środowiska wodnego przed szkodliwym wpływem emisji. Pełni ona kluczową rolę w gospodarce ściekowej oraz w ochronie środowiska wodnego, zwłaszcza w odniesieniu do wód powierzchniowych, do których kierowane są oczyszczone ścieki. Jest to jedna z najkosztowniejszych i najtrudniejszych do wdrożenia dyrektyw Unii Europejskiej, definiująca szereg pojęć związanych z gospodarką ściekową, wprowadzająca konieczność zapewnienia kanalizacji zbiorczej i komunalnych oczyszczalni ścieków dla gmin oraz regulująca metody i technologie oczyszczania ścieków.

W Polsce, pełnoprawnym członku Unii Europejskiej, konieczne było dostosowanie prawa krajowego do standardów unijnych. W ramach wdrażania prawa unijnego przepisy krajowe musiały być dostosowane do ponad 80 dyrektyw jedynie w obszarze „środowisko”. W chwili przystąpienia do Unii Europejskiej Polska zobowiązała się również do spełnienia wymagań Dyrektywy Rady 91/271/EWG [26]. Dlatego utworzono Krajowy Program Oczyszczania

Ścieków Komunalnych (KPOŚK), mający na celu uregulowanie kwestii związanych z gospodarką ściekową oraz nadanie priorytetu ich realizacji, aby spełnić stosowne zobowiązania. Przepisy omawianej dyrektywy zostały wdrożone do prawa krajowego i odzwierciedlają się w wielu ustawach i rozporządzeniach regulujących gospodarkę wodną. W 2000 roku przyjęcie Ramowej Dyrektywy Wodnej 2000/60/WE [27] (*Water Framework Directive*) zakończyło pewien etap w określaniu polityki wodnej UE [25,5]. Europejski Zielony Ład rozpoczyna kolejny etap batalii na rzecz eliminacji zanieczyszczeń, której celem jest neutralność klimatyczna i zrównoważony rozwój UE [28]. W komunikacie prasowym Rady Unii Europejskiej ze stycznia 2024 r. czytamy, że Rada i Parlament Europejski porozumiały się w sprawie jednej z propozycji „regulacyjnego pakietu” dotyczącego nowelizacji dyrektywy o oczyszczaniu ścieków komunalnych (nowe przepisy o skuteczniejszym oczyszczaniu i monitorowaniu). Jeden z zapisów dotyczy wdrożenia do 2039 r. i 2045 r. przez państwa członkowskie stosowania oczyszczania ścieków trzeciego (tj. usuwania azotu i fosforu) i czwartego (tj. usuwania szerokiego spektrum mikrozanieczyszczeń) stopnia w większych zakładach o RLM wynoszącej co najmniej 150 000 [29].

Do krajowych aktów prawnych związanych z gospodarką wodno-ściekową i osadami komunalnymi należą przede wszystkim:

1. Ustawa z dnia 20 lipca 2017 r. Prawo wodne – stanowi kluczowy akt prawny regulujący kwestie związane z gospodarką wodną, w tym gospodarką wodno-ściekową. Określa zasady zarządzania zasobami wód, ochrony przed powodzią, korzystania z wód, oraz zagadnienia związane z ochroną i użytkowaniem wód.
2. Ustawa z dnia 27 kwietnia 2001 r. Prawo ochrony środowiska – reguluje szeroko pojęte kwestie ochrony środowiska, w tym również zagadnienia związane z gospodarką wodno-ściekową. Określa m.in. standardy jakości wód, wymogi dotyczące oczyszczania ścieków, i procedury oceny oddziaływania na środowisko.
3. Ustawa z dnia 7 czerwca 2001 r. o zbiorowym zaopatrzeniu w wodę i zbiorowym odprowadzaniu ścieków – to kluczowe rozporządzenie dotyczące zbiorowego zaopatrzenia w wodę oraz zbiorowego odprowadzania ścieków, określające prawa i obowiązki podmiotów zarządzających systemami wodno-ściekowymi; reguluje również kwestie dezynfekcji ścieków szpitalnych [36].
4. Ustawa z dnia 13 września 1996 r. o utrzymaniu czystości i porządku w gminach – reguluje przede wszystkim kwestie związane z indywidualnymi systemami

gospodarowania nieczystościami ciekłymi na terenie prywatnych, nieskanalizowanych nieruchomości.

5. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 18 listopada 2014 r. w sprawie warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzaniu ścieków do wód lub do ziemi oraz w sprawie substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego.
6. Rozporządzenie Ministra Budownictwa z dnia 14 lipca 2006 r. w sprawie sposobu realizacji obowiązków dostawców ścieków przemysłowych oraz warunków wprowadzania ścieków do urządzeń kanalizacyjnych.
7. Rozporządzenie Ministra Gospodarki Morskiej i Żeglugi Śródlądowej z dnia 12 lipca 2019 r. w sprawie substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego oraz warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzaniu do wód lub do ziemi ścieków, a także przy odprowadzaniu wód opadowych lub roztopowych do wód lub do urządzeń wodnych.
8. Rozporządzenie Ministra Gospodarki Morskiej i Żeglugi Śródlądowej z dnia 27 lipca 2018 r. w sprawie sposobu wyznaczania obszarów i granic aglomeracji.
9. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 6 lutego 2015 r. w sprawie komunalnych osadów ściekowych [150].

W celu zapewnienia bezpieczeństwa sanitarnego i dobrej jakości mikrobiologicznej wód znaczącym krokiem w europejskich działaniach jest unijny kierunek dot. recyklingu ścieków, mający na celu ich ponowne wykorzystanie. Zdolność UE do sprostania nasilającej się presji na załagodzenie problemów związanych z deficytem wodnym może wzrosnąć dzięki ponownemu wykorzystaniu oczyszczonych ścieków, co przełoży się na ograniczenie eksploatacji jednolitych części wód powierzchniowych i podziemnych oraz zmniejszy wpływ zrzutów oczyszczonych ścieków do wód powierzchniowych. Poprawę obecnego stanu można osiągnąć, promując ochronę zasobów wody poprzez ponowne wykorzystanie ścieków komunalnych przy zapewnieniu wysokiego poziomu ochrony środowiska.

18 lipca 2007 r. Komisja Europejska wydała komunikat w sprawie „Rozwiązania problemu dotyczącego niedoboru wody i susz w Unii Europejskiej”. W dokumencie tym ustanowiono hierarchię środków, które państwa członkowskie powinny rozważyć w przypadku niedoboru wody oraz wystąpienia suszy. Wynika z niego, że w sytuacji, gdy dla danego regionu zastosowano wszystkie środki zapobiegawcze (zgodnie z przyjętą hierarchią) i gdy nadal zapotrzebowanie na wodę przewyższa podaż, po należytych rozważeniach kosztów i korzyści w określonych okolicznościach, dodatkowa infrastruktura wodociągowa może służyć jako

alternatywna metoda łagodzenia skutków poważnej suszy. 9 października 2008 r. przyjęto rezolucję w sprawie sposobu rozwiązania problemu dotyczącego niedoboru wody i susz w Unii Europejskiej, a 14 listopada 2012 r. wydano komunikat Komisji: „Plan ochrony zasobów wodnych Europy”, który wskazuje na potrzebę uregulowania standardów ponownego wykorzystania wody na szczeblu UE w celu usunięcia barier w rozpowszechnianiu alternatywnych źródeł zaopatrzenia w wodę, czyli takich, które mogłyby przyczynić się do zmniejszenia niedoboru wody i złagodzenia podatności na zagrożenia systemów podaży wody. Następnie w komunikacie „Zamknięcie obiegu - plan działania UE dotyczący gospodarki o obiegu zamkniętym” z 2 grudnia 2015r. Komisja Europejska zaproponowała promowanie ponownego wykorzystania oczyszczonych ścieków, w tym propozycje legislacyjne określające minimalne wymagania w kwestii ponownego wykorzystania wody. Zobowiązała się również do podjęcia szeregu działań ułatwiających ponowne użytkowanie uzdatnionych ścieków. Celem przyjętego rozporządzenia dotyczącego ponownego wykorzystania ścieków jest ułatwienie, we wszystkich sytuacjach, w których ponowne użycie wody jest właściwe i opłacalne, reguł jej stosowania poprzez stworzenie skutecznych ram prawnych [1].

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2020/741 [2] w sprawie minimalnych wymogów dotyczących ponownego wykorzystania wody, zostało przyjęte 25 maja 2020r. i po upływie trzyletniego *vacatio legis*, zaczęło obowiązywać wszystkie kraje członkowskie (od 26 czerwca 2023 r.). Obecne wytyczne dotyczące ponownego wykorzystania ścieków obejmują cztery główne obszary, w zależności od zastosowania/ponownego użycia. Są to: normy fizykochemiczne, normy mikrobiologiczne, procesy oczyszczania ścieków (technologie) oraz techniki nawadniania. Stopień zaawansowania procesów i poziom kontroli zależą od konkretnego zastosowania (np. nawadnianie zieleni/krajobrazu czy upraw rolniczych) oraz charakterystyki samej uprawy (przeznaczona do spożycia po przetworzeniu lub w formie surowej). Systemy irygacyjne są ogólnie klasyfikowane zgodnie z ich potencjalnym wpływem na zdrowie ludzi, z uwzględnieniem długotrwałych i krótkotrwałych ekspozycji takich jak nawadnianie z góry czy za pomocą systemów kropelkowych. Najwyższe standardy uzdatniania są zawsze wymagane przy nawadnianiu upraw paszowych. Zagrożenia dla zdrowia, zarówno te związane z mikroorganizmami chorobotwórczymi, jak i składnikami fizykochemicznymi, muszą być uwzględniane zwłaszcza wówczas, gdy odzyskana woda jest używana do pośredniego uzupełniania naturalnych zasobów [30]. Omawiane rozporządzenie, które jest w pełni zgodne z ideą gospodarki o obiegu zamkniętym, ma na celu poprawę dostępności wody i skłonienie do jej wydajniejszego wykorzystywania [31].

4. Dezynfekcja ścieków i ich ponowne wykorzystanie – praktyki stosowane w kraju i na świecie

4.1. Dezynfekcja ścieków w kraju i na świecie

W Polsce praktyka eksploatacyjna oczyszczania ścieków nie obejmuje powszechnej, ciągłej dezynfekcji ścieków oczyszczonych w komunalnych oczyszczalniach. Pomimo zadowalających, spełniających wymagania unijnej dyrektywy, wskaźników fizykochemicznych, brak ciągłej dezynfekcji może prowadzić do złej kondycji wód powierzchniowych i stale pogorszającej się jakości mikrobiologicznej wód odbiornika [32] (zgodnie z wynikającą z Rozporządzenia [33] klasyfikacją jakości wód w Polsce).

Zgodnie z ustawą o zbiorowym zaopatrzeniu w wodę i zbiorowym odprowadzeniu ścieków w Polsce obowiązkowo dezynfekowane są ścieki pochodzące ze stacji krwiodawstwa, szpitali, zamkniętych placówek lecznictwa (zajmujących się chorobami zakaźnymi). Bakterie szpitalne są śmiertelne, ponieważ często ulegają mutacji, aby uodpornić się na antybiotyki. Z analizy ścieków szpitalnych odprowadzanych do kanalizacji wynika, że zawierają one m.in.: bakterie *Escherichia coli*, enterokoki, wirusy zapalenia wątroby, HIV i wiele bakterii uodpornionych na antybiotyki. Drobnoustroje te dostają się do oczyszczalni ścieków, gdzie przeżywają i przedostając się do rzek, zanieczyszczają wody powierzchniowe. Następnie, dezynfekcji podlegają ścieki pochodzące z zakładów leczniczych dla zwierząt oraz laboratoriów prowadzących badania z materiałem zakaźnym pochodzącym od zwierząt [34,35].

W odniesieniu do zakładów przemysłowych dezynfekcja jest wymagana, gdy ścieki zawierają różnego rodzaju substancje szczególnie szkodliwe. Dlatego obowiązkowej dezynfekcji podlegają ścieki przemysłowe m.in. z garbarni, rzeźni i zakładów utylizacyjnych. Niektóre kraje europejskie stosują częściową dezynfekcję ścieków odprowadzanych z oczyszczalni lub dezynfekują ścieki w określonych porach roku. Praktyka eksploatacyjna dezynfekcji ścieków w kraju i na świecie została szeroko opisana przez Michałkiewicz i in. w publikacji „Dezynfekcja ścieków” [35]. Autorzy wskazują, że dezynfekcję stosuje się również do: ścieków i osadów pościekowych przed ich wykorzystaniem w rolnictwie, np. do nawadniania lub jako nawóz; ścieków oczyszczonych wykorzystywanych do uzupełnienia warstwy wodonośnej; oczyszczonych ścieków pochodzących z instytutów badawczych inżynierii genetycznej i organizmów genetycznie zmodyfikowanych (GMO). Ponadto dezynfekowane są również ścieki rozprowadzane na terenach rekreacyjnych – ścieki komunalne mogą stanowić potencjalne źródło zanieczyszczeń na plażach i w kąpieliskach; mogą także prowadzić do infekcji uszu i oczu podczas aktywności sportowych takich jak

pływanie czy nurkowanie [35]. Awaryjnie dezynfekowane są również ścieki miejskie w sytuacjach takich jak wybuch epidemii, awarie oczyszczalni czy zbyt niskie stany wody w odbiorniku.

4.2. Ponowne wykorzystanie ścieków oczyszczonych

Ścieki bytowe od wieków były zagospodarowywane do różnych celów na całym świecie. W zależności od ilości zasobów wodnych i zamożności kraju ich wykorzystanie obejmuje rozmaite dziedziny życia społecznego, a recyklingowi podlegają różnej jakości ścieki po różnych stopniach uzdatniania: zdezynfekowane, oczyszczone lub jedynie podczyszczone.

Pierwsze historyczne doniesienia o ponownym wykorzystywaniu ścieków do nawadniania sięgają czasów minojskich (ok. 3200–1100 p.n.e.), i dotyczą obszarów Krety, Hellady, Mohenjo-Daro (ok. 2600–1900 p.n.e.) oraz doliny Indusu [36,37]. W późniejszych stuleciach w hellenistycznych Atenach stosowane były różnego rodzaju dreny i kanały ściekowe, służące do odprowadzania zarówno wody deszczowej, jak i ścieków zebranych na terenie miasta do zbiorczego zbiornika zlokalizowanego poza granicami metropolii [38]. Następnie z tego basenu ścieki odprowadzono przewodami na tereny równin rolnych i wykorzystywano do ich nawadniania. Podobne systemy istniały w południowo-wschodniej części Akropolu [39]. W latach 1500–1800 zaczęto tworzyć pierwsze tzw. „gospodarstwa kanalizacyjne” lokalizowane w pobliżu dużych miast Europy Środkowej, stanowiące próbę ochrony zdrowia publicznego i kontroli naturalnych zanieczyszczeń systemów wodnych [40]. Wielka epidemia cholery i duru brzuszego w Anglii w latach 1830–1850 i jej związek z zanieczyszczeniem źródeł wody ściekami surowymi uwypukliła potrzebę sanitacji i ochrony zasobów wodnych. Wydarzenia te zmotywowały Agencję Zdrowia Publicznego do ustalenia zasad sanitarnych i polityki środowiskowej, mających na celu ochronę zdrowia publicznego [40,41]. Funkcjonujące oczyszczalnie ścieków w większości przypadków służyły jednak tylko jako miejsca gromadzenia ścieków, a nie ich efektywnego oczyszczania i późniejszego ponownego wykorzystywania [42].

Pierwsze projekty ponownego użytkowania wody były realizowane w Stanach Zjednoczonych – w Kalifornii i na Florydzie – już na początku XX wieku. Niedobór wody i korzyści z jej recyklingu dla pól rolnych były głównymi czynnikami sprzyjającymi rozwojowi tej praktyki. Władze stanu Kalifornia dostrzegły korzyści środowiskowe oraz ekonomiczne (uwzględniając też potencjalne zagrożenia dla zdrowia ludzkiego) i w 1918 roku przygotowały pierwsze przepisy regulujące recykling wody w rolnictwie (*California State Board of Health* [43,44]). Regulacje, opracowane przez Kalifornijski Departament Zdrowia

Publicznego, do dziś uznawane są za najbardziej rygorystyczne prawodawstwo dotyczące dezynfekcji ścieków na świecie [45]. Koncepcja norm opracowanych w Kalifornii, które zakładają eliminację zagrożeń dla zdrowia publicznego, opiera się na kilku założeniach:

- wartości graniczne wskaźników zanieczyszczeń wód naturalnych, przeznaczonych na cele rekreacyjne, powinny być 500 razy wyższe niż wskaźniki wody pitnej;
- zachowanie tych wartości eliminuje ryzyko wystąpienia zachorowań i stanu epidemii;
- ewentualne przekroczenia tych wartości w wodach słonych zdarzają się tylko w przypadku nagłych zanieczyszczeń wód.

Stosowanie tych wytycznych wymaga zatem obowiązkowego wprowadzenia procesu dezynfekcji ścieków [35]. Na całym świecie istnieje co najmniej 60 krajów stosujących różne rodzaje ponownego wykorzystania wody. Trudno jednoznacznie wskazać, które z nich odzyskują największą ilość ścieków (m.in. z uwagi na bardzo ograniczone dane w tym zakresie). Trudno również porównać efektywność odzysku m.in. ze względu na różnice w wielkości populacji czy obszaru danego kraju. Przykłady ponownego wykorzystania odzyskanej wody w różnych państwach umieszczono w tabeli 1.

Tabela 1. Ponowne wykorzystanie ścieków i cele na przyszłość. Przykłady z kraju i ze świata [opracowanie własne na podstawie danych literaturowych]

Kraj	Sposób ponownego wykorzystania	Lit.
Polska	Oczyszczalnia ścieków AQUA Bielsko-Biała – uzupełnianie wody w stawach rybnych i procesach technologicznych. Gmina Gołuchów – stosowanie oczyszczonych ścieków do nawadniania systemem zalewowym upraw wierzby energetycznej. W Łodzi oczyszczone ścieki z oczyszczalni miejskiej są używane do chłodzenia elektrociepłowni – EC Łódź. W Krakowie oczyszczone ścieki stosuje się do chłodzenia kominów elektrowni, a także do mycia ulic. W Poznaniu oczyszczone ścieki są wykorzystywane do produkcji pary wodnej w Elektrowni „Zawadzkie”. Wkrótce zostanie uruchomione największe tego typu przedsięwzięcie – Projekt Blue Bridge, w którym płocka oczyszczalnia będzie wykorzystywała najnowsze technologie oczyszczania, w tym m.in. oczyszczanie membranowe oraz adsorpcję węglową. Dzięki tym procesom uzyskana woda będzie spełniała normy jakościowe i będzie nadawała się do ponownego użytkowania w procesach produkcyjnych Orlenu.	46, 47
Kalifornia	46% całkowitej rocznej ponownej redystrybucji wody jest wykorzystywane w rolnictwie.	48
	w 2023 r. władze stanu Kalifornia zatwierdziły przepisy zezwalające przedsiębiorstwom wodociągowym na recykling ścieków i udostępnianie ich jako wody pitnej.	49

Floryda	44% całkowitej rocznej ponownej redystrybucji wody używa się do celów rolniczych.	49
Singapur	Kraj zaspokaja obecnie 30% swojego zapotrzebowania na wodę poprzez odzysk ścieków i dąży do zwiększenia wskaźnika ponownego wykorzystania do 55% do 2060 r. Projekt NEWater.	50, 51, 52, 53
Izrael	Wskaźnik ponownego wykorzystania ścieków w 2015r. wynosił ponad 80% ścieków bytowych pochodzących z gospodarstw domowych.	51, 54
Francja	Dezynfekuje się ścieki pochodzące z oczyszczalni znajdujących się w bezpośrednim sąsiedztwie plaż (zazwyczaj stosuje się w tym celu dwutlenek chloru).	55, 35
Niemcy Monachium	Dezynfekuje się ścieki (z wykorzystaniem promieniowania ultrafioletowego), zwłaszcza w celu utrzymania higieny sanitarnej miejskiego basenu, który znajduje się nad rzeką Saarą, poniżej strumienia oczyszczonych ścieków odprowadzanych z tego obiektu.	56, 35
Portugalia	Obszar nawadniany oczyszczonymi ściekami mieści się w przedziale od 35 000 do 100 000 hektarów, zależnie od czasu retencji zbiornika na ścieki.	56
Cypr	38 200 hektarów jest nawadnianych oczyszczonymi ściekami.	16
Włochy	Głównym zastosowaniem ścieków jest nawadnianie obejmujące 28 285 hektarów.	16
Hiszpania	Około 70% ścieków jest używane do nawadniania (41% do nawadniania rolniczego, około 31% do nawadniania pól golfowych i parków publicznych), 17% do celów środowiskowych, 7% do celów rekreacyjnych, 4% do użytku miejskiego, 0,3% do celów przemysłowych.	57, 58, 59, 60
Belgia, Flandria	Projekty wykorzystujące odzyskaną wodę do celów pitnych: Torreale/Stwe, zakład André w Belgii oraz zakład w Langford w Essex w Wielkiej Brytanii, zaopatrujące gospodarstwa domowe w oczyszczone ścieki włączane wcześniej do przybrzeżnej warstwy wodonośnej.	61
Wielka Brytania, Essex		53
Katar	Odzyskane ścieki wykorzystywane są m.in. w rolnictwie i kształtowaniu krajobrazu, w branży chłodniczej, jako woda uzupełniająca do ćwiczeń przeciwpożarowych, w zastosowaniu niezdatnym do picia m.in. w budownictwie (np. mieszanie betonu) i robotach drogowych oraz do spłukiwania urządzeń sanitarnych.	62, 63, 64
Arabia Saudyjska	Cel: zwiększenie wskaźnika recyklingu ścieków o ponad 90%; oczekuje się, że ponowne wykorzystanie wody w sektorze rolnym wzrośnie prawie 1,3-krotnie do 2035 r. Podobny wzrost przewiduje się również w sektorze kształtowania krajobrazu, gdzie przybliżona wysokość ponownego wykorzystania w 2035 r. ma wynieść 560 mln m ³ /rok. Rokowania wskazują, że poza tymi dwoma obszarami ponowne wykorzystanie ścieków w sektorze przemysłowym będzie stanowić około 13% całkowitego ponownego wykorzystania wody i wyniesie około 2130 mln m ³ /rok w 2035 r.	65
Tunezja	Wyznaczono długoterminowe cele polegające na nawodnieniu ponad 25 000 ha i uzupełnieniu warstw wodonośnych 30 milionami m ³ oczyszczonych ścieków.	66
Abu Zabi	Wizja Środowiskowa 2030 zakłada recykling 100% oczyszczonych ścieków do 2030 r.	55

W porównaniu ze stosowaną praktyką recyklingu ścieków niektórych bogatych państw pozaeuropejskich ponowne wykorzystanie wody w Unii Europejskiej jest nadal niskie [67] – w 2021r. wynosiło zaledwie 1,7 miliarda m³, czyli mniej niż 5% całkowitej ilości wytwarzanych ścieków i mniej niż 1% całkowitego poboru wody w UE. Z wyjątkiem nawadniania do celów rolniczych w Hiszpanii, Włoszech i innych krajach śródziemnomorskich ponowne wykorzystanie wody w UE jest niewielkie, głównie ze względu na wystarczającą (jeszcze) dostępność wody ze źródeł konwencjonalnych oraz wysokie koszty [59].

Należy mieć świadomość panujących na świecie dysproporcji. Ponad 80% ścieków w Europie jest poddawana procesom oczyszczania [68,69,70,68] (jak podają inne źródła, ponad 94% populacji zamieszkałej w Unii Europejskiej jest podłączone do jednej z istniejących komunalnych oczyszczalni ścieków, zgodnych z dyrektywą EWG/91/271 [52,71,72,73]. Sytuacja na świecie, szczególnie w krajach rozwijających się, wygląda zgoła inaczej. Jak zauważa Rodriguez-Villaneuva i in.[59], na świecie około 80% ścieków odprowadza się do odbiorników wodnych bez wcześniejszego oczyszczenia. Oczyszczanie ścieków szacuje się na poziomie 70%, 38%, 28% i 8% odpowiednio w krajach o wysokim, średnim wyższym, średnim niższym oraz niskim dochodzie.

Pomimo zbiorowych wysiłków podjętych na całym świecie źródła wody pitnej dla co najmniej 2 miliardów ludzi są skażone fekaliami – co roku to przyczyna ponad pół miliona zgonów z powodu biegunki (większość w krajach rozwijających się [74]). Niedobór wody stanowi palący problem, który nęka obszar Bliskiego Wschodu i Afryki Północnej, tzw. region MENA (ang. *Middle East and North Africa*) – ponad dwie trzecie z 20 krajów o największym niedoborze wody znajduje się w tym regionie [75]. Inne źródła [76] wskazują, że co najmniej 12 krajów w regionie arabskim i Azji Zachodniej posiada mniej niż 500 m³ odnawialnych zasobów wody na mieszkańca/rok. Droogers i in. [77] już w 2012 r. przewidywali, że niedobór wody w regionie MENA wzrośnie w latach 2041–2050 o około 290% w porównaniu z niedoborem wynoszącym 42 000 mln m³/rok w latach 2001–2010. Biorąc pod uwagę średni szkodliwy wpływ zmian klimatycznych, przewidywano, że rozbieżność w poziomie wody w MENA będzie w przybliżeniu czterokrotna lub większa w latach 2041–2050 [76,78,78]. Na podstawie prognoz rocznego zapotrzebowania na wodę do roku 2050 wynika, że sektor rolniczy jest i będzie największym konsumentem wody w ciągu najbliższych kilkunastu lat. Obecnie zapotrzebowanie na wodę w regionie MENA przekroczyło już jej naturalne zasoby o 20% [76,55].

Jest oczywiste, że zapotrzebowanie na ścieki jako źródło nawadniania będzie wzrastać szybciej w suchych i półsuchych regionach krajów rozwijających się. Postęp w zakresie rozwiązań prawnych i technologii może zapewnić adekwatne dostawy wody, jak również bezpieczne zarządzanie odpadami. Dlatego kluczowymi kwestiami technicznymi i politycznymi w krajach rozwijających się są lepsze zarządzanie nieoczyszczonymi ściekami w gospodarstwach rolnych i społecznościach wiejskich, promowanie praktyk rolniczych i upraw w miejscach, gdzie ścieki stanowią główne źródło nawadniania, a także rozwijanie skutecznych strategii ochrony pracowników i konsumentów przed patogenami oraz potencjalnie szkodliwymi substancjami chemicznymi zawartymi w ściekach. Wysiłki techniczne i polityczne mające na celu poprawę procesów oczyszczania, dystrybucji oraz zarządzania ściekami przyniosą korzyści poprzez lepsze gromadzenie przez władze krajowe i regionalne danych dotyczących produkcji, oczyszczania, unieszkodliwiania oraz ponownego wykorzystania ścieków [10].

5. Zagrożenia mikrobiologiczne odpływów z oczyszczalni ścieków

5.1. Ścieki i ich oczyszczanie

Odbiornikami ścieków oczyszczonych są przede wszystkim wody powierzchniowe, w tym rzeki dopływające do Morza Bałtyckiego oraz w mniejszym stopniu bezpośrednio samo Morze Bałtyckie. Jak wspomniano we wstępie do pracy, tylko 44% wód powierzchniowych w Europie osiąga dobry lub bardzo dobry stan ekologiczny, a stan mórz otaczających kontynent określany jest jako zły [79]. Polska, jako jedno z państw nadbałtyckich, zobowiązana jest do respektowania wytycznych Konwencji o ochronie środowiska morskiego regionu Morza Bałtyckiego [80]. Kluczowym jej celem jest minimalizacja w wodach Bałtyku zjawiska eutrofizacji, powodowanego przez nadmiar biogenów, pochodzących przede wszystkim ze ścieków. W trakcie negocjacji poprzedzających przystąpienie Polski do Unii Europejskiej ustalono, że całe terytorium Polski stanowi 99,7% zlewni Morza Bałtyckiego, w związku z czym kwalifikuje się do obszarów tzw. wrażliwych. Oznacza to obowiązek redukcji uwalnianych ze ściekami związków azotu i fosforu, a także substancji ulegających biodegradacji. Tabela 2 podsumowuje liczbę zanieczyszczeń odprowadzanych do Morza Bałtyckiego wraz z rzekami (odbiornikami ścieków).

Tabela 2. Wielkość ładunku zanieczyszczeń/Odpływ substancji organicznych i biogenych rzekami wprowadzany do wód Morza Bałtyckiego za pośrednictwem rzek w tysiącach ton na rok; źródło: [81,82].

	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2017	2018	2019	2020	2021
Dopływ zanieczyszczeń rzekami do Bałtyku [tys. Mg/rok]											
BZT ₅	263,7	170,4	109,8	149,3	108,0	88,2	107,7	148,9	98,42	101,19	136,5
Azot ogólny	322,6	191,8	103,4	170,3	112,8	76,6	189,6	140,9	89,72	98,54	136,0
Fosfor ogólny	16,2	10,4	6,7	10,5	10,8	4,8	7,6	7,7	4,81	5,27	6,40

Brak danych za rok 2016 oraz 2022 [83,82,83]

Osiągnięcie oczekiwanego efektu oczyszczania ścieków, nazywanego także stopniem oczyszczania lub sprawnością oczyszczalni ścieków, jest rezultatem analizy rodzaju zanieczyszczeń oraz charakterystyki ścieków dostarczanych do oczyszczalni przy jednoczesnym uwzględnieniu warunków, jakim powinny odpowiadać ścieki odprowadzane do odbiornika. Jakość oczyszczonych ścieków musi być zgodna z normami określonymi w odpowiednich aktach prawnych, takich jak Rozporządzenie dotyczące warunków

wprowadzania ścieków do wód lub do ziemi, a także regulacje dotyczące substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego.

Po roku 1990 Polska zmieniła podejście do procesu oczyszczania ścieków, zastępując metody biologiczne, skupione głównie na usuwaniu zanieczyszczeń organicznych, technologią skoncentrowaną na efektywnym usuwaniu związków azotu i fosforu (tzw. metody z pogłębionym usuwaniem związków azotu i fosforu). Aktualnie, zgodnie z wymogami prawno-ustawowymi, wszystkie aglomeracje liczące powyżej 10 000 RLM muszą dysponować oczyszczalniami wyposażonymi w zaawansowane technologie usuwania biogenów. Jednocześnie metody ograniczające się jedynie do mechanicznej obróbki ścieków praktycznie przestały być stosowane, ustępując miejsca innowacyjnym podejściom nakierowanym na kompleksowe usuwanie zanieczyszczeń [84].

Na świecie istnieją zalecenia dotyczące jakości ścieków oczyszczonych uwzględniające przede wszystkim kwestię zanieczyszczeń fizyko-chemicznych. Chodzi przede wszystkim o zawartość biogenów (azotu i fosforu), ilość zawartej w ściekach zawiesiny, wysokość wskaźników charakteryzujących BZT₅ czy ChZT. Okazuje się jednak, że dodatkowym problemem zasługującym na uwagę jest zagadnienie podwyższonego poziomu soli w ściekach odprowadzanych z niektórych oczyszczalni. Problemy z zasoleniem występują najczęściej w obiektach zlokalizowanych na obszarach przybrzeżnych, najprawdopodobniej z powodu intruzji wody morskiej lub wtargnięcia z płytkich warstw wodonośnych do miejskich systemów kanalizacyjnych [85]. Woda o wysokim stężeniu soli może powodować zmniejszenie produktywności rolnictwa i pogorszenie jakości gruntów (w przypadku jej odzysku i ponownego wykorzystania w rolnictwie) [52]. Ponadto dotychczasowe zalecenia prawne określające wymogi dotyczące jakości ścieków odprowadzanych z oczyszczalni, nie wszędzie uwzględniają zachowanie odpowiednich standardów mikrobiologicznych. Gdziekolwiek istnieją takie zalecenia, są one ustalane na podstawie przepisów krajowych i/lub międzynarodowych, które zazwyczaj opierają się na wyliczeniu bakterii z grupy *coli* (dokładniej: bakterie z grupy *coli* ogółem, bakterie z grupy *coli* typu kałowego lub *Escherichia coli*), ze zmiennymi wartościami progowymi w zależności od przeznaczenia ścieków (odprowadzanie ścieków oczyszczonych do odbiorników – środowiska lub ich ponowne wykorzystanie). Należy mieć świadomość, że przeciętny ściek z oczyszczalni biologicznej zawiera od kilkuset tysięcy do około miliona bakterii z grupy *coli* na każde 100 ml [86].

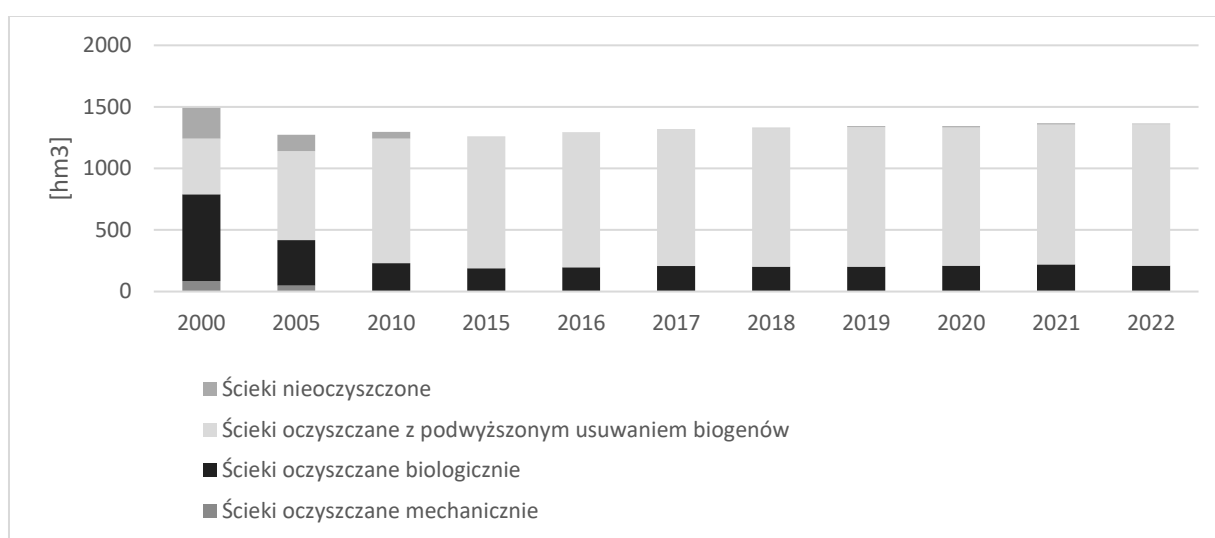
Oczyszczanie ścieków bytowo-gospodarczych stanowi bardzo istotny element eliminacji drobnoustrojów chorobotwórczych, gdyż wprowadzenie do wód powierzchniowych ścieków skażonych bakteriologicznie bez końcowej dezynfekcji może znacznie pogorszyć ich stan

sanitarny i stwarzać poważne zagrożenie dla zdrowia i życia ludzi oraz zwierząt. Trafiające do oczyszczalni ścieki bytowo-gospodarcze zawierają zanieczyszczenia biologiczne w postaci bakterii, wirusów, grzybów i pasożytniczych robaków, które przez swój charakter mogą stanowić poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Do najczęściej izolowanych należą bakterie występujące w przewodzie pokarmowym ludzi i innych zwierząt stałocieplnych, m.in.: *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* oraz *Vibrio spp* [87]. Zalicza się tu także *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus faecalis*, *Leptospira spp.*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae*. Ścieki są źródłem licznych mikroorganizmów patogennych, oportunistycznych oraz antybiotykoopornych, w tym wielolekoopornych, głównie pochodzenia jelitowego. Drobnoustroje chorobotwórcze mogą przeżyć przez pewien czas poza ustrojem żywiciela, dlatego też ich obecność w ściekach, osadach ściekowych, w wodzie czy w glebie stanowi zagrożenie sanitarne [88,89]. Odprowadzanie ścieków oczyszczonych do wód powierzchniowych wciąż wiąże się z szeregiem następujących negatywnych wpływów na te odbiorniki:

- Zanieczyszczenia resztkowe: oczyszczalnie ścieków nie zawsze usuwają wszystkie substancje chemiczne i mikroorganizmy. W wyniku tego procesu do wód powierzchniowych mogą przedostawać się resztkowe zanieczyszczenia, w tym substancje farmaceutyczne, środki chemiczne czy mikroplastik [90,91].
- Zagrożenia chemiczne: odprowadzane do wód substancje chemiczne mogą rzutować na fizykochemiczną równowagę wody, co ma potencjalnie szkodliwy wpływ na organizmy wodne, ich siedliska oraz inne składniki ekosystemu [92,93].
- Zmiana struktury biologicznej: oczyszczone ścieki mogą wpływać na strukturę i funkcje ekosystemów wodnych. Wprowadzanie substancji obcych do wód może prowadzić do zmian w składzie gatunkowym oraz zaburzać równowagę biologiczną [94,95].
- Zagrożenia dla ekosystemów żyjących w wodzie: oczyszczone ścieki mogą wpływać negatywnie na różnorodność biologiczną wodnych ekosystemów, co może powodować zmniejszenie populacji organizmów wodnych, w tym ryb i bezkręgowców.
- Zanieczyszczenia bakteryjne: pomimo procesów oczyszczania oczyszczone ścieki mogą nadal zawierać bakterie i wirusy. Niektóre patogeny mogą pozostawać w oczyszczonych ściekach. Ich dostanie się do wód powierzchniowych może stanowić zagrożenie dla zdrowia ludzi oraz zwierząt wodnych [96,97,98].

- Zjawisko rezydualności: niektóre substancje chemiczne mogą wykazywać się długim okresem utrzymywania w środowisku. Może to powodować kumulację tych substancji w organizmach wodnych i glebie.
- Substancje toksyczne: oczyszczalnie mogą nie zawsze efektywnie usuwać substancje toksyczne pojawiające się w ściekach pochodzących ze źródeł przemysłowych lub domowych. To z kolei może wywołać trwałe skażenie wód powierzchniowych [99].

Skalę problemu odprowadzania i oczyszczania ścieków w Polsce w wybranych latach pomiędzy 2000 a 2022 r. obrazują dane przedstawione na wykresie 1.



Wykres 1. Liczba ścieków komunalnych wytwarzanych w wybranych latach pomiędzy 2000–2022 r. wraz z metodami ich oczyszczania.

Źródło: opracowanie własne na podstawie [82]; załącznik 1

Analiza danych przedstawionych na wykresie 1 ukazuje systematyczną poprawę systemu gospodarki ściekowej w kraju. Coroczny wzrost poziomu oczyszczonych ścieków jest zauważalny, co przekłada się na minimalne fluktuacje odsetka ścieków niepoddanych żadnym procesom oczyszczania [82].

Jak podaje K. Budzińska i in. [90], w ściekach nieoczyszczonych średnia ilość bakterii *Escherichia coli* wynosi około $8,71 \cdot 10^6$ jtk/1ml (różnice pomiędzy poszczególnymi próbkami ścieków mogą wynosić 2 jednostki logarytmiczne). Badania wskazują, że spośród identyfikowanych bakterii w ściekach surowych, paciorkowce kałowe stanowią grupę oscylującą między $3,0 \cdot 10^4$ a $9,5 \cdot 10^5$ jtk/1ml ścieków surowych. W badaniach Szumilas i in. [100] zauważa się, że „przeciętny poziom zanieczyszczenia bakteryjnego ścieków surowych wynosi w odniesieniu do bakterii *coli* typu kałowego $9,3 \times 10^{18}$ w 100 cm³ oraz $1,8 \times 10^{20}$ w 100 cm³ [w zależności od oczyszczalni], a w odniesieniu do paciorkowców kałowych

odpowiednio $5,6 \times 10^5$ i $1,8 \times 10^6$. Przy sanitarnej ocenie ścieków korzysta się z metody pośredniej, polegającej na wykrywaniu bakterii uznanych za tzw. wskaźniki sanitarne, są to przede wszystkim bakterie z grupy *coli* i *E.coli*” [90].

Analizy próbek ścieków po etapie mechanicznego oczyszczania wykazują znaczną redukcję liczby bakterii wskaźnikowych. Średnia liczba bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* wynosi $8,97 \cdot 10^6$ (z zakresu od $6,18 \cdot 10^5$ do $3,45 \cdot 10^7$ jtk/ml). Mechaniczne oczyszczanie ścieków prowadzi do eliminacji tych mikroorganizmów na poziomie 85,5%. Mniej skuteczne jest usuwanie komórek bakterii *E. coli*, których średnia liczba na tym etapie oczyszczania wynosi $8,71 \cdot 10^6$ komórek w 1 ml ścieków. Procentowa redukcja po tym etapie procesu usuwania zanieczyszczeń ze ścieków wynosi 63,59%. Kawamura i Kaneko [101] w swoich badaniach potwierdzają zmniejszenie liczby *E. coli* średnio o 60÷70% po mechanicznym oczyszczaniu. Najwolniejszym tempem eliminacji (na tym etapie) cechują się paciorkowce kałowe (48,50%). Na podstawie danych literaturowych [46,102] można też stwierdzić, że w procesach mechanicznego oczyszczania usuwa się ze ścieków około 20% ogólnej liczby bakterii oraz 90% bakterii z rodzaju *Salmonella* i prątków gruźlicy. Proces sedymentacji eliminuje przede wszystkim mikroorganizmy zaadsorbowane na cząstkach zawieszin w ściekach. W zależności od efektywności procesu sedymentacji w osadach wstępnych można usunąć od 25÷75% bakterii [103]. Dodatkowe procesy oczyszczania ścieków pozwalają na dalsze obniżenie zawartości mikroorganizmów [89,90]. Metcalf i Eddy [46] podają typowe efektywności usuwania bakterii ze ścieków w procesach ich oczyszczania. Wartości te zamieszczono w tabeli 3.

Tabela 3. Usuwanie lub unieszkodliwianie mikroorganizmów w procesach oczyszczania ścieków

Proces	Efektywność usuwania mikroorganizmów [%]
Kraty rzadki	0–5
Kraty gęste	10–20
Piaskownik	10–25
Sedymentacja	25–75
Chemiczne strącanie	40–80
Złóża biologiczne	90–95
Osad czynny	90–98
Dezynfekcja chlorem oczyszczonych ścieków	98–99,999

Proces biologicznego oczyszczania stanowi najważniejszy etap osiągnięcia oczekiwanej jakości ścieków odprowadzanych do odbiorników. Istotną rolę odgrywa w nim aktywność metaboliczna mikroorganizmów, które są kluczowe dla rozkładu substancji organicznych. Chociaż technologie biologicznego oczyszczania ścieków są wynalazkiem ludzkości, to opierają się głównie na naturalnych procesach samooczyszczania, podobnych do tych, jakie zachodzą w naturalnych zbiornikach wodnych. Różnica polega na stworzeniu optymalnych warunków usuwania zanieczyszczeń ze ścieków, takich jak obecność tlenu, dostarczanie substancji odżywczych, mechaniczne mieszanie, kontrola temperatury, utrzymanie odpowiedniego pH itp., co przyspiesza i zwiększa skuteczność procesu [104]. Dodatkowo należy pamiętać, że naturalne zanieczyszczenia typowe dla obszarów ludzkich osiedli – odprowadzane z gospodarstw domowych i instytucji publicznych ścieki bytowo-gospodarcze, resztki żywności, ścieki przemysłu rolno-spożywczego itp. – są podatne na mineralizację przez drobnoustroje. Składają się one głównie z różnorodnych substancji naturalnych, takich jak cukry, białka, tłuszcze, oraz produktów ich hydrolizy i pochodnych, które mikroorganizmy wykorzystują jako źródło pierwiastków biogenych i energii. Wraz z postępem cywilizacji i wprowadzeniem nowych technologii często produkowane są substancje trudno ulegające rozkładowi, takie jak konserwanty, detergenty, związki metali ciężkich, itp., co ogranicza aktywność drobnoustrojów i wydłuża czas utylizacji ścieków. Ponadto w ściekach znajdują się inne rodzaje zanieczyszczeń, takie jak ciała stałe, substancje rozpuszczone i praktycznie nierozpuszczalne związki nieorganiczne, zawiesiny organiczne oraz rozpuszczalne substancje organiczne, a także mikroorganizmy [105]. Uznaje się, że im wyższy stopień oczyszczania, tym skuteczniejsze jest usuwanie mikroorganizmów chorobotwórczych.

Wśród wielu technologii oczyszczania ścieków należy wymienić m.in. biologiczne oczyszczanie ścieków z wykorzystaniem reaktorów MBR, MBBR, SBR, BFM, oczyszczanie przy użyciu biogranulatów, fitoremediację, stawy ściekowe czy komory z osadem czynnym. Metody te, oprócz technologii, różnią się między sobą efektywnością eliminacji bakterii patogennych oraz powszechnością ich wykorzystania w kraju i na świecie. Stawy ściekowe są często klasyfikowane jako tlenowe, naturalne (nazywa się je także stabilizacyjnymi), tlenowe napowietrzane oraz fakultatywne (tlenowo-beztlenowe). Metoda ta znajduje zastosowanie w oczyszczaniu ścieków z niewielkich miejscowości, głównie na obszarach wiejskich [106]. W stawach ściekowych zachodzą procesy samooczyszczania, wynikające z interakcji procesów fizycznych i biochemicznych, kierowanych przez światło i tlen, oraz z udziałem mikroorganizmów wodnych, zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych. Proces oczyszczania powoduje znaczną redukcję zawartości azotu, potasu i fosforu, głównych

składników odpowiedzialnych za eutrofizację wód. Stawy ściekowe ograniczają także emisję amoniaku do atmosfery [107,108]. W badaniach nad stawami biologicznymi potwierdzono znaczną redukcję liczebności bakterii wskaźnikowych w trakcie procesu biologicznego oczyszczania ścieków w stawach stabilizacyjnych, na poziomie 93÷98%. Liczba bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* w ściekach po pierwszym stawie stabilizacyjnym wynosi średnio $2,67 \cdot 10^5$ jtk/ml, a po oczyszczaniu w drugim stawie stabilizacyjnym $3,39 \cdot 10^3$ jtk/ml. Eliminacja tych mikroorganizmów to odpowiednio 97,82% po pierwszym stawie i 99,99% po drugim stawie stabilizacyjnym [101]. Liczba bakterii *Escherichia coli* w ściekach oczyszczonych w stawach stabilizacyjnych utrzymuje się natomiast na poziomie $10^3 \div 10^4$ jtk/ml, a procent redukcji wynosi odpowiednio 98,64% i 99,92% [109,90].

W części doświadczalnej pracy, z uwagi na najwyższy stopień redukcji mikroorganizmów oraz powszechność metody, wykorzystano ścieki oczyszczone pochodzące z komunalnych oczyszczalni stosujących biologiczne oczyszczanie ścieków z użyciem metody osadu czynnego.

W przeprowadzonych przez różnych autorów badaniach dotyczących skuteczności eliminacji mikroorganizmów chorobotwórczych w procesach biologicznego oczyszczania ścieków przy użyciu metody osadu czynnego efektywności te wynoszą kolejno: 90÷98% obniżki ogólnej liczby bakterii, 55÷98% obniżki bakterii z rodzaju *Salmonella* i 45% obniżki prątków gruźlicy, natomiast liczba bakterii *Escherichia coli* po oczyszczaniu biologicznym kształtuje się w zakresie od 10^5 do 10^6 jtk/ml. Walczak i Donderski [110] stwierdzają, że w procesie mechaniczno-biologicznego oczyszczania ścieków można osiągnąć eliminację fekalnych bakterii grupy *coli* na poziomie 97,28%, paciorkowców kałowych 85,97%, a bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* usuwane są w 96,18%. Podobnie wysoki procent redukcji podają inni naukowcy [111,112,90]. Badania przeprowadzone m.in. przez Stampi [113], Koivunen [114] i Olańczuk-Nayman [115,116,117,118] potwierdzają że klasyczne procesy oczyszczania ścieków zapewniają wysoki, bo sięgający niemal 99% stopień redukcji liczby bakterii. Pomimo wysokich procentów redukcji [119] dla wszystkich oznaczanych drobnoustrojów, pozostała liczba mikroorganizmów w oczyszczonych ściekach nadal jest jednak znacząca. Ścieki po procesie oczyszczania wciąż zawierają około od 10^4 do 10^6 /100 ml wskaźnikowych bakterii grupy *coli*. Enterobakterie stanowią najliczniejszą grupę ($9,97 \cdot 10^2$), paciorkowce kałowe występują na poziomie $4,57 \cdot 10^2$, a liczba *E. coli* wynosi $1,19 \cdot 10^2$ komórek w 1ml oczyszczonych ścieków [90]. Badania przeprowadzone przez Szumilas i in. [101] podnoszą przeciętny poziom zanieczyszczenia ścieków oczyszczonych, wskazując kolejno: od $3,7 \times 10^7$ do $2,8 \times 10^8$ w 100 cm³ (w zależności od oczyszczalni) w odniesieniu do bakterii *coli* typu

kałowego oraz około $2,3 \times 10^4$ w odniesieniu do paciorkowców kałowych. Należy pamiętać, że ścieki komunalne zawierają zwykle wiele gatunków bakterii, a każdy z nich ma wiele szczepów. Biologiczne procesy oczyszczania w oczyszczalniach ścieków mogą powodować selektywną eliminację, zmianę proporcji lub jedno i drugie w populacjach bakterii [120]. Na uwagę zasługuje również fakt, że nawet przy wysokim stopniu redukcji procesy oczyszczania ścieków okazały się nieskuteczne w obniżaniu częstotliwości występowania wieloopornych szczepów bakterii *E. coli* (w tym opornych na antybiotyki) [121] czy szczepów *E. coli* o właściwościach uropatogennych, które mogą przetrwać wszystkie etapy oczyszczania ścieków, w tym III etap – dezynfekcję [122]. Z powyższego wynika, że ścieki oczyszczone odprowadzane do środowiska z oczyszczalni nadal mogą zawierać różnego rodzaju substancje wpływające negatywnie na ekosystem wodny i zdrowie publiczne. Przykładowo metabolizm bakterii działa w ten sposób, że jeśli konkretna grupa, np. *E. coli*, jest dominującą bakterią w zrzutach ścieków, może ona konkurować z rodzimą mikroflorą i przerastać ją. Może to z kolei prowadzić do zwiększonego poziomu bakterii wskaźnikowych w zbiornikach wodnych, a ładunek ludzkich bakterii chorobotwórczych może znacznie przekroczyć czynniki ekologiczne i dopuszczalne granice [123]. Jak wykazały badania przeprowadzone przez E.M. Anastasi i in. [123], 56% szczepów *E. coli* niosących VG [ang. *Virulence genes*], czyli zjadliwe szczepy (w tym szczepy uropatogenne odporne na metody oczyszczania ścieków i dezynfekcji), znalezionych w wodach środowiskowych było identyczne z tymi wykrytymi w końcowym etapie oczyszczania ścieków. Autorzy przywołują również innych badaczy [124,125,126,127,128], którzy udowodnili obecność patogennych szczepów *E. coli* i powiązanych z nimi VG pochodzących ze ścieków i/lub odchodów zwierzęcych w wodach środowiskowych. Badania te potwierdzają ustalenia, że niektóre szczepy *E. coli* (jeśli nie większość z nich) w wodach środowiskowych są nosicielami VG związanych z uropatogenną *Escherichia coli* lub patogenną jelitową bakterią *E. coli* [129,123], a ponadto ścieki pochodzące z oczyszczalni ścieków zmieniają różnorodność i liczebność bakterii opornych (szczególnie z rodziny *Enterobacteriaceae*) w strumieniach odbiorczych. Większość wyizolowanych bakterii opornych to patogeny oportunistyczne dla człowieka [99].

Niebezpieczeństwo związane z niewystarczającym oczyszczaniem ścieków wynika z obecności w nich, oprócz bakterii z grupy *coli*, również występowania m.in. enterokoków, wirusów, wiroidów i prionów [130], *Clostridia* redukujących siarczany, *Salmonella spp.*, *Cryptosporidium spp.*, *Giardia spp.*, protistów, grzybów i inwazyjnych robaków pasożytniczych [35]. Te zanieczyszczenia, odprowadzane do wód powierzchniowych, mogą akumulować się w uprawach poprzez nawadnianie, przenosząc cechy oporności na bakterie

jelitowe do konsumentów. Jak zauważają B. Quant i in.[131], bazując na wynikach badań Reinthaler i in.[132], Kay i in.[133] oraz Shannon i in.[134], oczyszczalnie ścieków komunalnych są znaczącymi emitorami mikrobiologicznych zanieczyszczeń do środowiska [135].

Mikroorganizmy, w tym patogenne i chorobotwórcze, w postaci żywych komórek lub form inwazyjnych przedostają się m.in. do:

- skratek zatrzymywanych na kratkach;
- piasku oddzielnego ze ścieków w piaskownikach;
- osadów pochodzących z osadników wstępnych i wtórnych [103];
- w ograniczonym stopniu, wraz z odprowadzaniem ścieków do odbiornika, do wód powierzchniowych.

To potencjalne zagrożenie dla zdrowia ludzkiego i realna degradacja środowiska (m.in. wód powierzchniowych), dlatego tak ważne jest stosowanie trzeciego etapu oczyszczania ścieków – dezynfekcji i higienizacji.

Poniżej przedstawiono i scharakteryzowano najistotniejsze zagrożenia mikrobiologiczne związane z procesem oczyszczania ścieków, takie jak: wirusy, bakterie, pierwotniaki pasożytnicze, pasożyty jelitowe czy grzyby.

5.2. Charakterystyka mikroorganizmów w ściekach

5.2.1. Wirusy

Zarówno wody stojące, jak i płynące, gleba, a przede wszystkim powietrze, stanowią naturalne środowisko dla wirusów. Mikroorganizmy te, pochodzące często z zanieczyszczonych ludzkimi odchodami systemów kanalizacyjnych [136], mogą być rozprzestrzeniane przez wodę/ścieki czy powietrze, jak również przez zwierzęta (komary, gryzonie, kleszcze).

Głównymi źródłami wirusów uwalnianych do ścieków są przede wszystkim szpitale, rzeźnie czy obszary mieszkalne. Szacuje się, że ścieki komunalne zawierają ponad 700 różnych rodzajów wirusów [137]. Po przedostaniu się wirusów do kanalizacji następuje spadek ich liczebności, z uwagi na rozcieńczenie z innymi ściekami, reakcję ze środkami chemicznymi (np. środkami dezynfekcyjnymi i detergentami) oraz inaktywację wirusów pod wpływem zmian fizykochemii wody (np. pH, temperatura i zawartość substancji stałych). Należy jednak pamiętać, że również w zależności od czynników takich jak temperatura, stężenie tlenu,

zawartość materii organicznej oraz rodzaj wirusa zmienia się czas przeżywalności wirusów w ściekach – mogą pozostawać w wodzie przez wiele dni, a nawet miesiące [138]. Niższe temperatury wydłużają ich przeżywalność, a tolerowany przez te mikroorganizmy chorobotwórcze zakres pH waha się od 5 do 9 [137].

Gdy wirusy przedostaną się do oczyszczalni ścieków, konwencjonalne oczyszczanie I i II stopnia są niewystarczające do zapewnienia ich całkowitego usunięcia ze ścieków (jest mało prawdopodobne, aby genomy wirusów i białka zewnątrzkomórkowe uległy łatwej denaturacji) [138]. Chociaż żadna z aktualnie stosowanych metod nie gwarantuje całkowitej eliminacji wszystkich wirusów ze ścieków, uważa się, że spośród metod biologicznych szczególnie skuteczna jest metoda osadu czynnego. Ostatecznym celem oczyszczania ścieków jest odprowadzanie do środowiska wody wolnej od wirusów. Dezynfekcja odgrywa zatem kluczową rolę w osiągnięciu tego celu, ale wybór środków dezynfekcyjnych musi być dostosowany do konkretnych potrzeb (należy unikać ich w wodach odprowadzanych do strumieni, ponieważ mogą szkodzić organizmom wodnym, chyba że można zneutralizować ich toksyczne działanie) [139] Gholipour i in.[140] zauważają, że choroby wywoływane przez wirusy jelitowe mogą mieć różne przebiegi, od błahych po ciężkie, a nawet śmiertelne. W przytoczonych przez nich badaniach wykazano, że wirusy stanowią większe zagrożenie dla zdrowia niż bakterie chorobotwórcze lub pierwotniaki obecne w ściekach [141,142,143]. Główną przyczyną pojawiania się wielu chorób jest przenoszenie wirusów ze środowiska na organizmy żywe m.in. za pośrednictwem wody czy ścieków. Do najpowszechniejszych infekcji należy zaliczyć: zapalenie żołądka i jelit, zaburzenia pracy serca, zapalenie spojówek, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, schorzenia układu oddechowego i zapalenie wątroby. Szacuje się, że 1,4–1,9 mln zgonów rocznie ściśle łączy się z dominującymi chorobami biegunkowymi przenoszonymi przez wodę/ścieki, związanymi z wirusami zidentyfikowanymi już w naturalnych lub sztucznych systemach wodno-ściekowych [144,138]. Co ciekawe, oprócz wirusów jelitowych w czasie niedawnej pandemii koronawirusa COVID-19 potwierdzono obecność wirusa SARS-CoV-2 w kale osób zakażonych, a w konsekwencji w ściekach i osadach ściekowych [145,146,141].

Szczególnie interesującą grupę stanowią enterowirusy. Obecnie znanych jest ponad 100 enterowirusów innych niż polio, a w osadach ściekowych rozpoznano obecność 3 typów wirusów polio, 23 wirusów Coxsackie z grupy A, 6 z grupy B, 28 echowirusów oraz wirusów zapalenia wątroby typu A, które mogą stanowić istotne zagrożenie dla zdrowia. Enterowirusy wykazują wysoką odporność na środki dezynfekujące, takie jak chlorowanie i promieniowanie UV, co sprawia, że mogą infekować środowisko przez długi czas [147]. WHO uznaje je za

jedne z najważniejszych czynników chorobotwórczych, powodujących 30 milionów zgonów rocznie. W osadach ściekowych istnieje także ryzyko napotkania bardzo niebezpiecznych wirusów, takich jak Ebola, wirus Zachodniego Nilu i Zika. Mogą być przenoszone z innych krajów i kontynentów ze względu na mobilność populacji – wzmacnia to potrzebę identyfikacji enterowirusów w osadach ściekowych, co jest wymagane w niektórych krajach, np. Francji i Stanach Zjednoczonych [148]. Ryzyko związane z poliwirusami pochodzi głównie z odchodów pacjentów i nosicieli. Enterowirusy, w tym poliwirusy, mogą powodować różnorodne choroby, od zapalenia mięśni i mózgu po infekcje jelitowe i gorączkę. Ich charakterystyczną cechą jest zdolność do utrzymywania się w środowisku i odporność na silne środki dezynfekujące [148].

W ostatnich latach wskazuje się również na duże zagrożenie ludzkimi norowirusami. Jest to jeden z rodzajów wysoce zaraźliwych wirusów jelitowych, który może być główną przyczyną epidemii, a także wirusowego zapalenia żołądka i jelit. Badania wykazały, że norowirusy charakteryzują się wysoką odpornością i dużą przeżywalnością – pomimo zastosowanych metod dezynfekcji ścieków (przede wszystkim chlorowania) były nadal wykrywalne w ściekach oczyszczonych [149].

Osady ściekowe stanowią źródło różnorodnych wirusów, takich jak rotawirus, który może być przyczyną zapalenia przewodu pokarmowego, adenowirus, wywołujący nieżyt nosa i zapalenie gardła, a także HIV i HCV, odpowiedzialne za zespół nabytego niedoboru odporności i zapalenie wątroby typu C [149]. Ciekawy jest fakt, że w rozporządzeniu Ministra Środowiska z dnia 6 lutego 2015 r. w sprawie stosowania komunalnych osadów ściekowych wirusy zostały pominięte, prawdopodobnie z powodu braku dostatecznych danych dotyczących ich obecności w osadach ściekowych [150]. Tymczasem występowanie tych patogenów w ściekach świadczy o potencjalnym zagrożeniu dla zdrowia publicznego oraz podkreśla potrzebę uwzględnienia analizy i regulacji dotyczących obecności wirusów w procesach oczyszczania ścieków. Wprowadzenie odpowiednich norm i monitorowanie obecności wirusów w ściekach czy osadach ściekowych mogłoby przyczynić się do skuteczniejszej ochrony środowiska i zdrowia społeczeństwa.

Wszystkie formy życia wykazują pewne podstawowe cechy, takie jak budowa komórkowa, zdolność do odżywiania, oddychania oraz możliwość przekazywania swoich cech potomstwu w procesach rozmnażania. Natomiast istnieją także obiekty takie jak wiroidy i priony, które nie spełniają tych klasycznych definicji życia, gdyż w przeciwieństwie do organizmów żywych nie posiadają budowy komórkowej i nie wykazują podstawowych funkcji życiowych, takich jak

odżywianie czy oddychanie. Dlatego też nie są zaliczane do królestwa żywych organizmów. Są to cząstki biologiczne, chorobotwórcze, a ich obecność jest potwierdzona w ściekach [151].

5.2.2. Bakterie

Różne mikroorganizmy odgrywają rozmaite role w procesie oczyszczania ścieków. Jedne – m.in. saprofityczne, możemy uznać za pożyteczne, inne za patogenne i chorobotwórcze. Bakterie wykorzystywane m.in. w osadzie czynnym pomagają w redukcji zanieczyszczeń i sprawiają, że ścieki stają się mniej szkodliwe dla środowiska. Istnieją trzy grupy bakterii, które pełnią kluczową rolę w oczyszczaniu ścieków: bakterie tlenowe, beztlenowe i fakultatywne.

Jak już wspomniano, oprócz bakterii saprofitycznych procesom oczyszczania ścieków towarzyszą różne bakterie patogenne przenoszone przez wodę/ścieki, które mogą stanowić poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Z jednej strony oczyszczanie ścieków jest ważnym procesem w działaniach związanych z ochroną środowiska, w tym w skutecznym usuwaniu niektórych patogenów, z drugiej jednak oczyszczalnie ścieków służą również za kluczowe rezerwuary patogenów środowiskowych, ponieważ zapewniają dobre warunki do ich wzrostu i reprodukcji [152]. Wśród całkowitej populacji patogenów obecnych w ściekach i mogących być potencjalnym zagrożeniem, aż 43% to bakterie [153,152]. Zagrożenie stanowią mogą zarówno bakterie patogenne zlokalizowane w ściekach, jak również te znajdujące się w osadzie czynnym. Badania pokazują, że w górnej warstwie spienionego osadu czynnego wykryto najwięcej gatunków patogennych i ich największą całkowitą liczebność. Sugeruje to, że warstwa ta może stwarzać większe zagrożenie dla pracowników oczyszczalni i mieszkańców obszarów położonych w okolicy oczyszczalni opartych na technologii osadu czynnego, ponieważ zawarte w niej patogeny łatwo przedostają się do powietrza i mogą powodować infekcje poprzez aerację [154]. Należy pamiętać, że czas przeżywalności patogenów w ściekach zależy od wielu czynników, takich jak stan fizjologiczny i budowa organizmu, a także wpływy środowiskowe, w tym potencjał redoks, temperatura, poziom pH i obecność szkodliwych substancji chemicznych (tabela 4).

Tabela 4. Przeżywalność organizmów chorobotwórczych w ściekach miejskich
Źródło: [155]

Organizmy	Czas przeżywalności w ściekach
<i>E. coli bacteria</i>	4–12 tygodni [156]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5–6 miesięcy
<i>Salmonella sp.</i>	do 1 roku
<i>Bacillus anthracis</i>	powyżej 50 lat
<i>Vibrio cholerae</i>	do 200 dni
<i>Giardia intestinalis</i>	do 3 miesięcy
<i>Enterowirusy</i>	od kilku tygodni do kilku miesięcy

Niezwykle ważne jest zrozumienie, że bakterie, w tym potencjalnie szkodliwe patogeny, są obecne w dużych ilościach w ściekach pochodzących z ludzkich i zwierzęcych źródeł, co stanowi istotne ryzyko dla zdrowia publicznego [139]. W związku z tym skuteczne oczyszczanie ścieków jest nie tylko kluczowe dla ochrony środowiska, ale także dla zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego społeczeństwu [157,158]. W tabeli 5, zostały opisane najważniejsze bakterie chorobotwórcze.

Tabela 5. Charakterystyka najważniejszych bakterii chorobotwórczych
[Opracowanie własne na podstawie danych literaturowych]

Bakterie – rodzaj	Charakterystyka	Lit.
Rodzaj <i>Salmonella</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Gram-ujemne pałeczki, nietworzące przetrwalników, fakultatywnie beztlenowe; - tworzą szereg bardzo blisko spokrewnionych bakterii należących do rodzaju <i>Salmonella</i> i rodziny <i>Enterobacteriaceae</i> – wykazują podobieństwa w metabolizmie i genetyce do bakterii <i>E. coli</i>, obejmują ponad 2000 podgatunków; - <i>Salmonella typhimurium</i> może wywoływać infekcje żołądkowo-jelitowe, podczas gdy <i>Salmonella typhi</i> jest odpowiedzialna za dur brzuszny; epidemie duru brzusznego często występują w warunkach niehigienicznych, związanych z zanieczyszczeniem wody pitnej; stosowanie ścieków rolniczych może prowadzić do zanieczyszczenia gleby, traw i warzyw bakteriami <i>Salmonella</i>; - okres inkubacji dla infekcji przenoszonych przez wodę wynosi od 12 godzin do 28 dni. 	157,159, 160,139, 161,162
Rodzaj <i>Shigella</i>	- rodzaj gamma-proteobakterii z rodziny <i>Enterobacteriaceae</i> ;	157,160, 162

	<ul style="list-style-type: none"> - bakterie Gram-ujemne, nieruchliwe, nietworzące zarodników, o kształcie pałeczki, które są bardzo blisko spokrewnione z <i>E. coli</i> i których gospodarzem jest zawsze człowiek; - zatrucie <i>Shigella flexneri</i> lub <i>Shigella dysenteriae</i> może prowadzić do wystąpienia w ciągu 12–48 godzin objawów obejmujących gorączkę i biegunkę, w towarzystwie śluzu, ropy i krwi. 	
Gatunek <i>Escherichia coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> - beztlenowa bakteria Gram-ujemna, znana jako pałeczka okrężnicy, należąca do rodziny <i>Enterobacteriaceae</i>; - występuje naturalnie w florze bakteryjnej jelita grubego ludzi i zwierząt stałocieplnych, stanowiąc około 1% ogólnej populacji bakterii; jest obecna także w glebie, wodzie i ściekach; - nie tworzy przetrwalników, a ich obecność w ściekach wynika z obecności świeżych fekaliów; - szczególnie szkodliwe grupy szczepów tego gatunku obejmują: enterotoksyczne <i>E. coli</i> (ETEC), które wytwarzają enterotoksyny; enteropatogenne <i>E. coli</i> (EPEC), wywołujące biegunki u niemowląt; enterokrwotoczne <i>E. coli</i> (EHEC), odpowiedzialne za krwotoczne zapalenie jelita grubego oraz enteroinwazyjne <i>E. coli</i> (EIEC), powodujące ostre biegunki podobne do czerwonki bakteryjnej; - wielu badaczy donosiło o izolacji <i>E. coli</i> z wód powierzchniowych, oczyszczonych ścieków i substancji stałych. 	160,157, 139,163, 164,165, 166,167
Rodzaj <i>Vibrio</i>	<ul style="list-style-type: none"> - należy do rodziny <i>Vibrionaceae</i>, która składa się z oportunistycznych patogenów; - cholera to ostra i wyjątkowo zakaźna choroba, atakująca przewód pokarmowy; charakteryzuje się objawami takimi jak wymioty i biegunka, co potencjalnie może prowadzić do ciężkiego odwodnienia organizmu; za rozprzestrzenianie się cholery odpowiedzialne są m.in. zanieczyszczone ścieki – potwierdza to wysoka częstotliwość występowania <i>V. cholerae</i> w próbkach wody/ścieków; - zakażenie <i>Vibrio</i> zwykle ustępuje samoistnie i nie wymaga leczenia klinicznego, jednak w leczeniu ciężkich przypadków wymagane są antybiotyki (ostatnie raporty podkreśliły wzrost obecności <i>Vibrio</i> opornego na antybiotyki w środowisku); - badania przeprowadzone w wybranych oczyszczalniach ścieków w Afryce wykazały obecność sześciu różnych gatunków <i>Vibrio</i> (ważnych z medycznego punktu widzenia) w ściekach oczyszczonych. Wskazuje to, że oczyszczalnie ścieków są potencjalnymi rezerwuarami patogenów <i>Vibrio</i>. 	168,169, 170,171, 172,139, 157,168, 162
Rodzaj <i>Leptospira</i>	<ul style="list-style-type: none"> - rodzaj niewielkich krętek tlenowych, z których gatunek <i>L. interrogans</i> jest czynnikiem etiologicznym choroby zwanej leptospirozą; - leptospiroza to rozpowszechniona choroba odzwierzęca, która każdego roku powoduje ponad milion zachorowań i 50 000 zgonów; bakterie przedostają się do organizmu człowieka przez rany skóry oraz błony śluzowej, a następnie rozprzestrzeniają się poprzez krwiobieg, atakując nerki i centralny układ nerwowy; uchodzi za potencjalne zagrożenie zawodowe hodowców zwierząt, pracowników rolnych oraz osób zatrudnionych w oczyszczalniach ścieków. 	173,174, 175,172, 162

<p>Rodzaj <i>Mycobacterium</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - jeden z najważniejszych rodzajów saprofitycznych bakterii chorobotwórczych, wszechobecny w środowiskach wodnych; - wyróżniamy: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> oraz prątki atypowe, nazywane także niegruźliczymi; - często występuje jako liczny rodzaj bakterii w osadzie czynnym w wielu oczyszczalniach ścieków [176]. Nawet po 124 dniach zjadliwe szczepy (VG), nadal są wykrywalne w ściekach, mniej szkodliwe utrzymują się do 203 dni; - analiza oczyszczonych ścieków po dezynfekcji chlorem wykazała obecność klinicznie istotnych, wolno odrastających <i>M. kansasii</i>, <i>M. szulgai</i>, <i>M. gordonae</i> i <i>M. asiaticum</i>; - główne gatunki prątków występujące w oczyszczalniach ścieków są spokrewnione z <i>M. brumae</i>, <i>M. crocinum</i>, <i>M. sphagni</i> itp., z których większość należy do słabo scharakteryzowanej, szybko rosnącej grupy; - wykryto kilka oportunistycznych gatunków patogennych, co sugeruje potencjalne ryzyko infekcji <i>Mycobacterium</i> w oczyszczalniach ścieków; - w technologiach opartych na biologicznym oczyszczaniu ścieków <i>Mycobacterium</i> została uznana za jedną z bakterii odpowiedzialnych za pienienie się osadu czynnego, m.in. ze względu na wysoką hydrofobową powierzchnię komórek; należy pamiętać, że obecność tzw. aerozolowych prątków niegruźlicznych w pianie osadu czynnego stanowi potencjalne zagrożenie np. zakażeniem płuc przez powietrze; - gatunki <i>Mycobacterium</i> w osadzie czynnym stanowią od 0,2% do 4% pod względem liczebności genu 16S rRNA, zajmując od 2 do 60 pozycji wśród wszystkich sklasyfikowanych rodzajów bakterii; - wśród szczepów gruźlicy szczególnie istotne dla zdrowia ludzkiego są dwa typy: <i>humanus</i>, często powodujący gruźlicę płuc, oraz <i>bovinus</i>, związany z gruźlicą różnych narządów; - oprócz swojej patogennej roli <i>Mycobacterium</i> ma znaczenie dla środowiska ze względu na zdolność do rozkładu węglowodorów aromatycznych, heterocykli zawierających azot itp.; wiele <i>Mycobacterium spp.</i> jest zdolnych do degradacji lub transformacji steroidów, które są typowymi składnikami ludzkich odchodów (sterole są uważane za ważne substancje zanieczyszczające ze względu na ich estrogeny wpływ na bezkręgowce wodne). 	<p>139,157, 176,177, 159,178, 162</p>
<p>Rodzaj <i>Yersinia</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - zaliczane do rodziny <i>Enterobacteriaceae</i>, charakteryzują się pałeczkowatym kształtem oraz Gram-ujemną strukturą; - niektóre serotypy tej bakterii mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia ludzi; do infekcji zazwyczaj dochodzi poprzez spożycie zanieczyszczonej wody oraz produktów pochodzenia zwierzęcego; - <i>Yersinia enterocolitica</i> powoduje głównie ostre zapalenie jelit; do najczęstszych objawów zalicza się gorączkę, biegunkę i ból brzucha, ale czasami mogą wystąpić łżejsze zakażenia ogólnoustrojowe, takie jak ból stawów czy wysypka; - organizmy te znaleziono w źródłach wód powierzchniowych i gruntowych, ale ogólnie niewiele wiadomo na temat ich występowania w środowisku; 	<p>179,139, 157,162, 180</p>

	- <i>Yersinia</i> wydaje się podatna na dezynfekcje m.in. z wykorzystaniem chloru, w związku z czym uważa się, że odpowiednio zdezynfekowane źródła wody pitnej powinny być wolne od <i>Y. enterocolitica</i> .	
Rodzaj <i>Proteus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - charakteryzują się dużą zdolnością do adaptacji i rozwijają się w różnorodnych warunkach: w ściekach bytowych, przemysłowych, fragmentach gleby oraz naturalnych nawozach; - niektóre gatunki <i>Proteus</i>, takie jak <i>P. mirabilis</i>, <i>P. penneri</i> i <i>P. vulgaris</i> występują w wodach powierzchniowych; - większość szczepów bakterii z rodzaju <i>Proteus</i> wyizolowanych ze ścieków i wód powierzchniowych charakteryzuje się lekoopornością, w tym antybiotykoopornością; - odpowiadają za różne schorzenia, takie jak infekcje dróg żółciowych, infekcje dróg moczowych oraz choroby związane z bezpieczeństwem żywności; - szczególnie rozpowszechniony szczep bakteryjny, <i>P. vulgaris</i>, rozwija się w rozkładających się substancjach organicznych pochodzących z roślin i zwierzęcych szczątków; zatrucia pokarmowe, infekcje ucha środkowego, zakażenia dróg moczowych oraz zapalenie opon mózgowych to tylko niektóre z infekcji, które mogą być spowodowane przez te bakterie. Warto podkreślić, że <i>P. vulgaris</i> i <i>P. morgani</i> są często odpowiedzialne za występowanie biegunek u dzieci. 	181,139, 162
Gatunek <i>Francisella</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Gram-ujemna bakteria o nieruchomej naturze, charakteryzująca się ziarnistym kształtem, zdolna do rozwijania się w środowisku tlenowym; - wykazuje dużą odporność, co umożliwia jej przetrwanie w różnych środowiskach, takich jak gleba, woda i skażone szczątki zwierzęce; - gatunkiem typowym dla tego rodzaju jest <i>Francisella tularensis</i>, która obejmuje cztery podgatunki, tj. <i>tularensis</i>, <i>holarctica</i>, <i>mediasiatica</i> i <i>novicida</i>; - <i>F. tularensis</i> jest wysoce zakaźną bakterią wywołującą choroby u ssaków, w tym ludzi, i potencjalną bronią bioterrorystyczną; jest odpowiedzialna za wywoływanie zakaźnej choroby znanej jako tularemia; jej objawy obejmują gorączkę, bóle mięśni, bóle głowy i dreszcze. 	182,139, 162
<i>Clostridium perfringens</i>	<ul style="list-style-type: none"> - jest bezwzględnie beztlenową bakterią Gram-dodatnią o kształcie pałeczek, tworzącą endospory; - stanowi 0,5% mikroflory kałowej; występuje powszechnie w osadach ściekowych i jest odporna na ciepło, dlatego jej usuwanie może być powiązane z usuwaniem gatunków przetrwalnikujących, takich jak <i>Bacillus sp.</i>; - <i>C. perfringens</i> może być trudna do usunięcia nawet w III etapie oczyszczania ścieków; jest odporna na czynniki utleniające (ozonowanie) i dezynfekcję promieniami UV; - odporne zarodniki tej bakterii czynią ją zbyt oporną, aby mogła być użyteczna jako organizm wskaźnikowy – <i>C. perfringens</i> nie nadaje się jako wskaźnik zanieczyszczenia odchodami, ale można ją wykorzystać jako wskaźnik obecności odchodów ludzkich. 	183,160, 184,185

5.2.3. Pierwotniaki pasożytnicze

Pierwotniaki stanowią grupę organizmów jednokomórkowych z królestwa protistów, ustępujących pod względem wielkości jedynie algom wśród niższych eukariotów [186]. Mimo zdolności do tworzenia kolonii każda komórka zachowuje indywidualność. Obecność pasożytniczych pierwotniaków w różnych środowiskach stwarza duże zagrożenie dla zdrowia. Źródła zakażeń pasożytami obejmują wodę powierzchniową, glebę, baseny i kąpieliska, a także nieodpowiednie urządzenia sanitarne oraz spożywanie nieumytych, surowych produktów pochodzących z nawożonych odchodami (zwierzęcych lub ludzkich) ogrodów. Woda zanieczyszczona fekaliami stanowi pożywkę dla pasożytów takich jak *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia (intestinalis)* i *Toxoplasma gondii*. Wytwarzają one zarodniki (cysty i oocysty) i mogą stanowić poważne zagrożenie dla zdrowia.

Entamoeba histolytica, powszechnie występujący pasożyt jelitowy, infekuje około 10% światowej populacji. Wywołuje chorobę zwaną pełzakowicą, która może dawać objawy jelitowe lub pozajelitowe. Pasożyt przenoszony jest drogą kałową, a woda, warzywa i muchy pełnią rolę wspólnych nośników cyst. Objawy zakażenia mogą obejmować ból brzucha, biegunkę, wzdęcia i owrzodzenia w różnych obszarach organizmu. Wolno żyjące formy ameby można znaleźć w powietrzu, glebie, wodach słodkich i słonych [139].

Giardia lamblia, pasożyt wiciowaty, zaraża zarówno ludzi, jak i zwierzęta domowe oraz dzikie. Zarażenie następuje poprzez spożycie zanieczyszczonej wołowiny, zawierającej cysty wydalane z kałem zakażonych ludzi lub zwierząt. Chociaż infekcje często przebiegają bezobjawowo, przewlekła postać choroby może prowadzić do nawracających biegunek, nudności i wymiotów [187].

Balantidium coli to pasożytniczy pierwotniak, który zasiedla przewód pokarmowy ludzi, świń domowych i innych zwierząt, wywołując chorobę znana jako balantidioza. Szczególnie często występuje na obszarach wiejskich, gdzie kontakt z świniami jest powszechniejszy [172].

Cryptosporidium to z kolei pasożytniczy pierwotniak, występujący zarówno u ludzi, jak i zwierząt. Jego cykl życiowy obejmuje wiele stadiów endogennych i jeden etap egzogenny, polegający na uwalnianiu inwazyjnych oocyst do środowiska. Zarażenie następuje przez spożycie zanieczyszczonej wody lub kontakt z zanieczyszczonymi obszarami. Może wywołać chorobę zwaną kryptosporydiozą, która objawia się przewlekłą, ciężką biegunką, szczególnie dotkliwą dla osób z osłabionym układem odpornościowym [187].

5.2.4. Pasożyty jelitowe

Osady ściekowe, ze względu na wysoką zawartość substancji organicznej, tworzą specyficzną biocenozę, zasiedlaną przez różnorodne mikroorganizmy, takie jak bakterie, wirusy, grzyby, a także jaja pasożytów. Choroby wywołane przez pasożyty jelitowe, w tym *Ascaris sp.*, *Trichuris sp.* i *Toxocara sp.*, związane są z czynnikami cywilizacyjnymi oraz rozwojem i upowszechnieniem turystyki o zasięgu globalnym. W Polsce najczęstsze przypadki inwazji dotyczą *Ascaris lumbricoides* i *Trichuris trichura*, należących do rodziny helmintów. *Ascaris lumbricoides*, czyli glista ludzka, kolonizuje przewód pokarmowy człowieka, czerpiąc pokarm z uszkodzonego nabłonka jelita i wywołując glistnicę. Samice osiągają długość od 15 do 35 cm, a ich szerokość wynosi 0,2–0,4 cm [157]. W organizmach zarażonych osób samica glisty może wyprodukować do 200 tysięcy jaj dziennie. Jaja przedostają się do gleby wraz z kałem, gdzie zachowują zdolność przeżycia przez 2–5 lat. Zarażenie *Ascaris lumbricoides* następuje przez spożycie zanieczyszczonej żywności. *Trichuris sp.*, zwana włosogłówką, to kolejny kosmopolityczny nicien występujący w Polsce. Zarażenie następuje przez spożycie pokarmu zanieczyszczonego jajami pasożyta. Samice składają dziennie od 1000 do 6000 jaj [161]. Okres dojrzewania włosogłówki zależy od warunków środowiskowych, takich jak temperatura, wilgotność i rodzaj gleby i wynosi około 3 tygodnie. Choroba wywołana przez włosogłówkę, czyli włosogłowczyca, objawia się krwawą biegunką, śluzowatym stolcem, odwodnieniem, osłabieniem, bólem brzucha oraz nerwowością. Natomiast *Toxocara sp.*, pasożyt wywołujący toksokarozę, jest powszechnie obecny w osadach ściekowych. Choroba ta pojawia się w wyniku inwazji glisty psiej (*Toxocara canis*) lub glisty kociej (*Toxocara cati*). Larwy pasożyta, przedostając się do organizmu człowieka, powodują uszkodzenia tkanek i narządów wewnętrznych [158]. Do zakażenia dochodzi przez spożycie skażonej wody pitnej, warzyw zabrudzonych zanieczyszczonej glebą, a także poprzez kontakt z nieodrobaczonymi zwierzętami domowymi [159]. Objawy toksokarozy obejmują bóle głowy, drgawki, zmiany zachowania, zaćmę, zez, ślepotę, pogorszone widzenie, powiększenie węzłów chłonnych, wątroby, śledziony oraz niedokrwistość [157,159,172,186]. Badania przeprowadzone w Iranie [188] potwierdzają obecność jaj nicieni i oocyst pierwotniaków w ściekach oczyszczalni ścieków bytowych. Skuteczność usuwania tych form pasożytniczych jest niewystarczająca, a ich obecność w ściekach podkreśla potrzebę skrupulatnej kontroli i regulacji w celu zminimalizowania ryzyka zakażenia człowieka przez spożycie skażonych produktów [189].

W kontekście ścieków, zwłaszcza tych zawierających ekskrementy ze szpitali, wzrasta liczba chorobotwórczych bakterii i pasożytów. Te patogeny mogą przetrwać w ściekach przez

długi czas, co zwiększa ryzyko zakażenia chorobami takimi jak węglik, cholera, zapalenie wątroby, czerwonka czy różne zakażenia pasożytnicze [190,191].

5.2.5. Grzyby

Grzyby wodne odgrywają zasadniczą rolę w ekosystemach wodnych jako destruenci, konsumenci i reducenty. Biorą udział w mineralizacji substancji organicznej, co ma istotne znaczenie w samooczyszczaniu się wód. Badania nad grzybami wodnymi są również ważne z sanitarnego punktu widzenia, gdyż część z nich należy do grzybów chorobotwórczych dla ludzi i zwierząt [192]. Wody powierzchniowe – stawy i rzeki – stanowią naturalne miejsca bytowania różnego rodzaju grzybów wodnych. Wśród tej grupy znajdują się m.in. *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum candidum*, *Microsporium gypseum*, *Rhizopus nigrans*, *Trichophyton raubitschekii* oraz *Trichosporon cutaneum* [193].

Niektóre spośród grzybów należących do saprofitów bytujących w środowisku wodnym mogą być patogeniczne dla człowieka. W wodach powierzchniowych wykrywane są gatunki uznane za ważne czynniki etiologiczne grzybic skórnych i układowych. Do grzybów uchodzących za potencjalnie chorobotwórcze zalicza się: *Candida albicans*, *C. tropicalis* oraz *Trichosporon cutaneum*. *Trichosporon cutaneum* często jest przyczyną grzybic skóry człowieka i zwierząt. Do wód powierzchniowych prawdopodobnie przedostaje się wraz ze ściekami komunalnymi.

Wiele grzybów wodnych prowadzi pasożytniczy tryb życia, atakując organizmy takie jak ryby. Choroba zwana pleśniawką rybią, wywoływana głównie przez grzyby z rodziny *Saprolegniaceae*, z rodzajów *Saprolegnia*, *Achlya*, *Dictyuchus*, *Thraustotheca* i *Aphanomyces* jest jednym z przykładów tego typu infekcji. Niektóre grzyby wodne (grzyby keratynofilne *Blastocladiopsis parva*, *Catenaria anguillulae*, *C. verrucosa*, *Catenophlyctis variabilis*, *Lagenidium humanum* oraz *Rhizophyidium keratinophilum*) mogą rozwijać się także na skórze i włosach ludzi, zwierząt oraz piórach ptaków w wodach powierzchniowych, co stanowi potencjalne zagrożenie dla zdrowia. W zbiornikach wodnych wykrywane są również grzyby chitynofilne (notowane na organizmach mających chitynowe pancerzyki: skorupiaki, pajęczaki czy owady) takie jak: *Aphanomyces astaci*, *Karlingia chitinophila*, *Rhizidium chitinophilum*, *Asterophlyctis irregularis* i *Blastocladiella brytanica* [194].

Należy pamiętać, że grzyby mogą stanowić barierę w rolniczym wykorzystaniu osadów ściekowych przez tzw. dermatofity, które wywołują u człowieka zakażenia włosów, paznokci oraz skóry. Wyizolowane z osadów ściekowych gatunki dermatofitów są grzybami

patogennymi, a powodowane przez nie schorzenia skóry są bardzo powszechne w związku z łatwością przenoszenia się z człowieka na człowieka. Osady ściekowe stanowią dla grzybów bardzo dobre środowisko bytowania ze względu na występowanie dużej ilości składników odżywczych niezbędnych dla ich prawidłowego wzrostu [189].

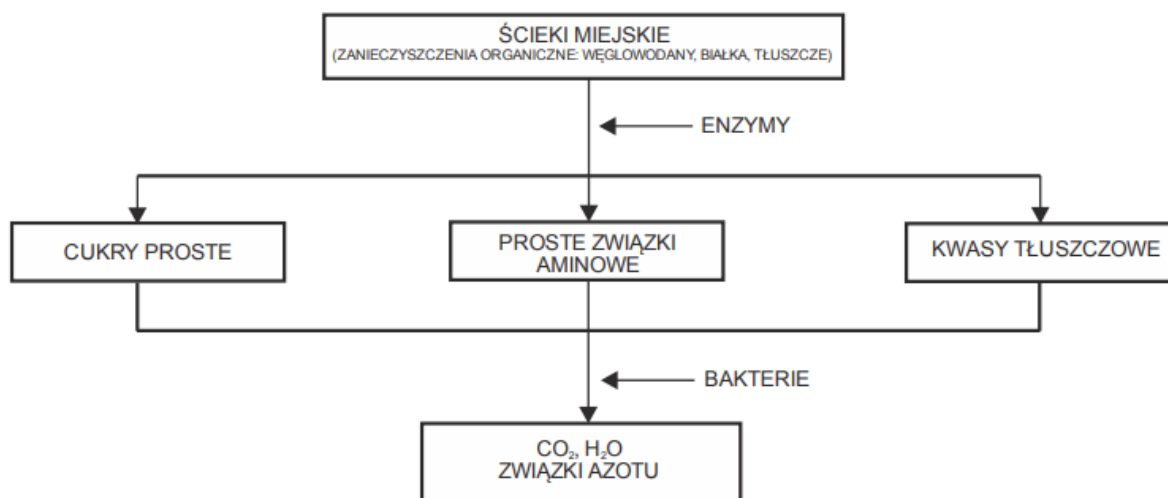
6. Możliwości poprawy jakości mikrobiologicznej ścieków w celu ich ponownego wykorzystania – dezynfekcja i higienizacja (metody biologiczne, fizyczne, chemiczne i łączone)

6.1. Biologiczne metody higienizacji ścieków – biopreparaty

Od lat istnieją oraz są efektywnie wykorzystywane różne metody biologicznego oczyszczania i dezynfekcji ścieków. Jedną z nich jest tzw. „zielona” dezynfekcja ścieków. Mowa tu m.in. o zastosowaniu zielonej chemii i nanotechnologii, w tym m.in. o fotokatalitycznych właściwościach nano-TiO₂ (używanego jako skuteczny środek dezynfekujący), jak również o syntezie nanocząstek srebra AgNPs z wykorzystaniem ekstraktu z *Vitis labrusca*, będącego w pełni naturalną bronią przeciwko bakteriom Gram-dodatnim i Gram-ujemnym. Raota i in. [195] wskazują, że materiały te doprowadziły do zmniejszenia o 47% liczby bakterii *Escherichia coli* podczas dezynfekcji ścieków, co pozwala sugerować, że mogą stanowić skuteczny środek pomocniczy w procesie „zielonej” dezynfekcji ścieków. Z kolei fotokataliza jest jedną z nowszych metod dezynfekcji, wykazującą dużą skuteczność w unieszkodliwianiu m.in. wirusów, grzybów, bakterii, a nawet komórek nowotworowych zawartych w ściekach. Fotokatalityczne właściwości nano-TiO₂ wykorzystuje się również do neutralizowania niepożądanych zapachów. Kosmala i in. [196] zauważają, że: „tlenek tytanu (IV) może działać jako niezwykle skuteczny środek dezynfekujący” [136].

W poszukiwaniu innowacyjnych technik uwaga badaczy i praktyków oczyszczania ścieków skierowała się na możliwość wykorzystania do tego celu biopreparatów. Stanowią one wsparcie dla procesów biodegradacji substancji organicznych oraz transformacji związków nieorganicznych. Ze względu na zróżnicowany skład stosowane dziś biopreparaty można podzielić na kategorie bakteryjne, grzybowe, enzymatyczne, bakteryjno/grzybowo-enzymatyczne oraz bakteryjno-grzybowe i enzymatyczne [197]. Wśród preparatów bakteryjnych i grzybowych można wyróżnić dwa główne rodzaje: preparaty jednoskładnikowe, zawierające pojedyncze szczepy mikroorganizmów, oraz biopreparaty wieloszczepowe, składające się z kilku szczepów mikroorganizmów o różnorodnych właściwościach i szerokim spektrum działania. Inna klasyfikacja opiera się na różnicach w zawartości związków organicznych aktywnych biologicznie oraz mikro- i makroelementów [198]. Ostatnie dziesięciolecia przyniosły istotny rozwój w dziedzinie biotechnologii, co umożliwiło lepsze zrozumienie mechanizmów działania biopreparatów (rys. 3) oraz poskutkowało opracowaniem bardziej efektywnych metod ich przygotowywania. Współczesne środki biologiczne

wyróżniają się zdolnością do degradacji różnorodnych związków organicznych, są naturalne, przyjazne dla środowiska i wykazują wysoką skuteczność [199].



Rysunek 3. Schemat działania preparatu enzymatyczno-bakteryjnego
Źródło: [199]

W kontekście biopreparatów enzymatycznych kluczową rolę odgrywają enzymy, stawiane na pierwszym planie przed bakteriami. Enzymy, zbudowane ze związków białkowych, pełnią funkcję katalizatorów w reakcjach biologicznych. Ich wyjątkowa selektywność pozwala na katalizowanie konkretnych reakcji z określonymi substratami. W przeciwieństwie do katalizatorów chemicznych nie zmieniają równowagi reakcji ani nie powodują przemian chemicznych, lecz jedynie obniżają energię aktywacji, przyspieszając proces. Biopreparaty mikrobiologiczne przeznaczone do oczyszczania ścieków często zawierają bakterie z rodziny *Pseudomonas* lub *Bacillus*, znane z aktywnego udziału w naturalnych procesach samooczyszczania w wodzie i glebie. W biopreparatach ich stężenie jest znaczne – przykładowo 1 g kultur bakteryjnych może zawierać od 10^4 do 10^9 bakterii. Proces produkcji biopreparatów opiera się na hodowli bakterii w kontrolowanych warunkach na pożywkach, a następnie szybkim ich wysuszeniu w warunkach mezofilnych, co skutkuje przejściem bakterii w formę przetrwalnikową. Alternatywną metodą uzyskiwania formy przetrwalnikowej jest liofilizacja, czyli gwałtowne suszenie ze stanu głębokiego zamrożenia. Technologia ta jest jednak kosztowna, a ponadto towarzyszy jej również ryzyko uszkodzenia komórek bakterii podczas procesu zamrażania. Enzymy obecne w biopreparatach są wytwarzane przez bakterie, rośliny lub grzyby, a ich masowa produkcja odbywa się przy udziale wyspecjalizowanych firm biotechnologicznych, takich jak Novonordisc czy Bacteria Conspects Inc. Dokładny skład biopreparatów zazwyczaj objęty jest tajemnicą handlową, powszechnie wiadomo jednak, że

biopreparaty zawierają nie tylko bakterie i enzymy, lecz także pożywki, takie jak trójpolifosforan sodu, siarczan amonu, substancje buforujące, środki powierzchniowo czynne i nośniki organiczne, na przykład śrutę sojową [199].

Biopreparaty bakteryjne są szczególnie skuteczne w degradacji zanieczyszczeń organicznych obecnych w ściekach rolniczo-spożywczych i bytowo-gospodarczych. Ich stosowanie wymaga regularności, lecz przynosi pozytywne rezultaty. Z kolei biopreparaty enzymatyczne znalazły zastosowanie interwencyjne w procesach udrażniania sieci kanalizacyjnej, osadników oraz komór osadu czynnego. Wyróżniają się także zdolnością usuwania zanieczyszczeń w trudnych warunkach, takich jak obecność substancji hamujących rozwój bakterii czy niska temperatura. Zasada działania biopreparatów, wspomagających degradację zanieczyszczeń, opiera się na wykorzystaniu związków organicznych jako źródła energii, węgla i elektronów. Dzięki temu mikroorganizmy w biopreparatach mogą rosnąć, rozmnażać się, a związki organiczne w wodach i ściekach ulegają stopniowej degradacji do nieszkodliwych produktów końcowych [157]. Szczepy bakterii mogą być przechowywane w formie liofilizatów, zamrożonych czy specjalnych zawiesin [200,201].

Kluczowym elementem skuteczności biopreparatów w procesach oczyszczania ścieków jest obecność bakterii kwasu mlekowego i związana z nimi produkcja aktywnych antagonistycznych metabolitów. Bakterie te wydzielają kwasy organiczne (mlekowy, octowy, mrówkowy, propionowy, masłowy, hydroksylowy i ftalowy), enzymy, chelaty metali, bakteriocyny i przeciwutleniacze [202,203]. Przeciwutleniacze przyczyniają się do poprawy separacji substancji stałych od cieczy, co stanowi podstawę w oczyszczaniu wody [204,205]. Badania sugerują, że obecność pożytecznych organizmów w biopreparatach powinna sprzyjać rozkładowi materii organicznej, przekształcając ją w dwutlenek węgla (CO_2), metan (CH_4) lub wykorzystując do wzrostu i reprodukcji [206,202,204].

Badania wykazują także, że wiele drobnoustrojów wydzielają substancje o antagonistycznym wpływie na wzrost i rozwój innych organizmów. Te substancje wpływają na konkurencyjne organizmy, osłabiając je lub niszcząc. Im szersze jest spektrum ich aktywności, tym większe są szanse przetrwania i dominacji wytwarzających je mikroorganizmów w danym środowisku [207]. Wśród interesujących metabolitów komórkowych o silnym działaniu antibakteryjnym znajdują się bakteriocyny. Są to białkowe substancje o masie cząsteczkowej od kilku do kilkudziesięciu kDa, wytwarzane przez różne grupy bakterii. Większość z nich charakteryzuje wąskie spektrum aktywności, gdyż działają głównie na bakterie blisko spokrewnione z organizmami je wytwarzającymi [208]. A. Sip i in.[209] zauważają, że istnieją bakteriocyny zdolne do oddziaływania na bakterie niespokrewnione z ich producentami. Zdolność do

produkcji bakteriocyn zazwyczaj jest cechą szczepową, a w obrębie danego gatunku może być obecna u 1-100% szczepów bakterii [210]. Przykładowo 75% szczepów *Listeria monocytogenes*, 63% szczepów *Lactobacillus acidophilus*, 40% szczepów *Escherichia coli* posiada zdolność do syntezy bakteriocyn. Statystycznie co 13 szczep bakteryjny zgromadzony w American Type Culture Collection wykazuje właściwości bakteriocynogenne (tabela 6) [209].

Tabela 6. Rodzaje bakterii zdolnych do produkcji bakteriocyn

Źródło: [209]

Bakterie Gram-dodatnie	Bakterie Gram-ujemne
<i>Bacillus</i>	<i>Actinobacillus</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Acetobacter</i>
<i>Carnobacterium</i>	<i>Bacterioides</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Brucella</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Caulobacter</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Citrobacter</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Enterobacter</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Erwinia</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Escherichia</i>
<i>Listeria</i>	<i>Haemophilus</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Halobacterium</i>
<i>Mycobacterium</i>	<i>Klebsiella</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>Niesseria</i>
<i>Propionibacterium Sarcina</i>	<i>Pasteurella</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>Proteus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Pseudomonas</i>
	<i>Salmonella</i>
	<i>Serratia</i>
	<i>Shigella</i>
	<i>Yersinia</i>
	<i>Vibrio</i>

Przykładowo substancja antybakteryjna/bakteriocyna wydzielana przez *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* wykazuje zdolność hamowania wzrostu bakterii, zarówno tych zdolnych do wytwarzania przetrwalników (jak *Bacillus* i *Clostridium*), jak i tych, które nie tworzą przetrwalników (jak *Listeria*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*), głównie bakterii Gram-dodatnich. Jej optymalna rozpuszczalność występuje w środowisku o kwaśnym pH. Ponadto wykazuje ona szerokie spektrum aktywności, co czyni ją skuteczną w zwalczaniu wielu różnych rodzajów bakterii.

Można dokonać klasyfikacji bakteriocyn ze względu na ich strukturę oraz zastosowanie. Takie podziały uwzględniają różnice strukturalne i funkcjonalne między bakteriocynami, co ma istotne znaczenie w zrozumieniu ich roli oraz potencjalnych zastosowań:

- Bakteriocyny o niskiej masie cząsteczkowej (poniżej 5 kDa):
 - Charakteryzują się obecnością nietypowych aminokwasów, takich jak lantionina.
 - Przykłady to nizyna, laktocyna S, laktycyna.
- Bakteriocyny o masie poniżej 10 kDa:
 - Termo-stabilne i aktywne wobec bakterii, zwłaszcza *Listeria*.
 - Należą do nich kurwacyna A, leukocyna (o aktywności uwarunkowanej współdziałaniem dwóch białek), oraz laktacyna G + M (aktywowana grupami tiolowymi po zredukowaniu reszty cysteinowej), a także laktokokcyna B.
- Termo-wrażliwe bakteriocyny o wysokiej masie cząsteczkowej (powyżej 30 kDa):
 - Przykłady to acidofilina A, laktacyna A i B.
- Bakteriocyny z obecnością części lipidowych lub sacharydowych:

Do tej kategorii należą leukonocyna i laktocyna 27 [211].

Jedno z pierwszych użycí biopreparatów w dziedzinie technologii ścieków miało miejsce w Stanach Zjednoczonych już w latach 30. XX wieku, kiedy za ich pomocą próbowano zintensyfikować proces fermentacji osadu [212]. Później znalazły zastosowanie głównie w osadnikach gnilnych [213]. W 1953 roku McKinney i Poliakoff [214] przeprowadzili badania nad wpływem biopreparatów na skuteczność procesu oczyszczania ścieków metodą osadu czynnego [215]. Jak przytacza Dymaczewski i in.[199], podobne eksperymenty przeprowadzali również Robinson w 1954r. [216], Bryan w 1969r.[217], Slotte w 1970r., Chambers w 1977r.[218], Yung w 1987r.[219], Aitken w 1993r.[220] oraz inni. Mimo że badania laboratoryjne nie zawsze jednoznacznie potwierdzały skuteczność biopreparatów, większość operatorów oczyszczalni stosujących EM-y (rozwińcie skrótu w dalszej części wywodu) obserwowała ich korzystny wpływ na procesy biologicznego rozkładu zanieczyszczeń [199]. Ponadto analizy laboratoryjne zintegrowanego, przydomowego systemu oczyszczania ścieków bytowych z obszarów AL-Gabal AL-Asfar w Egipcie wykazały, że wykorzystanie EM-ów w procesach oczyszczania ścieków znacznie zmniejszyło liczbę gatunków patogennych reprezentowanych przez bakterie z grupy *coli*, m.in. dzięki czemu końcowo oczyszczone ścieki

spełniały wymagania dotyczące ponownego wykorzystania ścieków w nawadnianiu do celów rolniczych [15].

W ostatnich kilku dekadach rozwój przemysłu i rolnictwa spowodował nadmierne wykorzystanie różnorodnych substancji chemicznych w celu degradacji zanieczyszczeń, a także w ochronie i plonowaniu roślin. Wraz ze wzrostem świadomości dotyczącej zagrożeń związanych z używaniem tych substancji podjęto poszukiwania nietoksycznych alternatyw, bezpiecznych zarówno dla środowiska, jak i zdrowia ludzkiego. Obecnie biopreparaty naturalne stanowią alternatywę dla preparatów chemicznych. Są to środki stworzone z wykorzystaniem szczepów bakterii saprofitycznych, głównie z rodzaju *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus*, grzybów (drożdży) i enzymów indukujących procesy biodegradacji zanieczyszczeń organicznych oraz podtrzymujących przemiany zanieczyszczeń nieorganicznych [157,200].

Biopreparaty obejmują współistniejące różnorodne, skuteczne, pożyteczne i niepatogenne mikroorganizmy. Ogólnie rzecz biorąc, tworzy je kombinacja gatunków tlenowych i beztlenowych, powszechnie występujących we wszystkich ekosystemach [202]. Zawierają około 80 różnych rodzajów mikroorganizmów, przyczyniających się do oczyszczenia i poprawy jakości mikrobiologicznej środowiska naturalnego. Wśród nich można wyróżnić bakterie fotosyntetyzujące, bakterie kwasu mlekowego, drożdże, promieniowce i grzyby fermentujące [221]. Biopreparaty EM (ang. *Effective microorganisms*) to jedne z najbardziej renomowanych biopreparatów na świecie, mające swoje korzenie w Japonii, gdzie zostały stworzone przez profesora Teuro Higę, eksperta w dziedzinie upraw roślin tropikalnych na Wydziale Rolnym Uniwersytetu Ryukyus w Okinawie [222,201]. Termin biopreparat wywodzi się z połączenia greckiego słowa *bios*, co oznacza życie, oraz łacińskiego *preparatum*, odnoszącego się do przygotowania [223]. W skład biopreparatów wchodzi bowiem żywe organizmy lub odpowiednio przygotowane produkty ich metabolizmu [224]. Mechanizm działania biopreparatów polega na wykorzystaniu substancji organicznych jako źródła węgla i energii przez zawarte w nich mikroorganizmy. Dzięki temu możliwy jest wzrost i rozwój drobnoustrojów, jednocześnie stopniowo biodegradujących substancje organiczne do nieszkodliwych produktów końcowych [201]. Stosowanie biopreparatów ma na celu hamowanie rozwoju patogennych grzybów lub bakterii [198].

Poniżej przedstawiono najważniejsze mikroorganizmy składające się na EM-y oraz sposób ich działania:

- Bakterie fotosyntetyzujące (*Rhodospseudomonas palustris* i *Rhodobacter spaeroides*) – to samożywne organizmy posiadające zdolność wytwarzania użytecznych substancji z materiału organicznego, szkodliwych gazów (siarkowodoru) i korzeni roślin, wykorzystujące jako źródło energii ciepło gleby i światło słoneczne. Występują zarówno jako organizmy tlenowe, jak i beztlenowe. Wyprodukowane przez nie substancje, takie jak aminokwasy, kwasy nukleinowe i substancje bioaktywne, wspomagają wzrost roślin i zwiększają działanie promieniowców.
- Bakterie kwasu mlekowego (*Lactobacillus plantarum*, *L. casei* i *Streptococcus lactis*) – odpowiadają za wytwarzanie kwasu mlekowego z cukrów i innych węglowodanów wyprodukowanych przez drożdże i bakterie fotosyntetyzujące. Kwas mlekowy działa jako skuteczny sterylizator, hamując rozwój szkodliwych mikroorganizmów i przyczyniając się do rozkładu materiału organicznego oraz zatrzymując rozwój szkodliwych mikroorganizmów, m.in. grzybów z rodzaju *Fusarium*. Te bakterie są również kluczowe w produkcji żywności, takiej jak jogurty czy kiszonki.
- Promieniowce (*Streptomyces albus* i *S. griseus*) – Gram-dodatnie bakterie, które z aminokwasów wydzielanych przez materię organiczną i bakterie fotosyntetyzujące produkują substancje antybiotyczne, hamujące rozwój szkodliwych bakterii i grzybów. Dodatkowo przyspieszają wiązanie azotu przez bakterie azotowe, występujące w korzeniach roślin motylkowych.
- Drożdże (*Saccharomyces cerevisiae* i *Candida utilis*) – syntetyzują antybiotyczne i pożyteczne substancje z cukrów i aminokwasów wydzielanych przez m.in. bakterie syntetyzujące. Produkują również enzymy i hormony, aktywizujące podział komórek. Dodatkowo ich wydzieliny stanowią pożyteczne substraty dla aktywnych mikroorganizmów, takich jak promieniowce czy bakterie mlekowe.
- Grzyby fermentujące (*Aspergillus oryzae*, *Penicillium sp.* i *Mucor hiemalis*) – przedstawiciele tej zróżnicowanej grupy organizmów nie są zdolni do produkcji pokarmu, dlatego odżywiają się martwą materią organiczną lub pasożytują na innych drobnoustrojach. Pełnią funkcję wspomagającą rozkład materiału organicznego, przyczyniając się do powstania estrów, alkoholu oraz związków antymikrobiologicznych [222,225,226].

Ważnym aspektem technologii mikrobiologicznej jest odpowiedni dobór biopreparatu. Skuteczny preparat musi zawierać mikroorganizmy, które znajdują sprzyjające warunki do rozwoju i adaptacji w danym środowisku. Na polskim rynku dostępne są liczne biopreparaty mikrobiologiczne, a od kilku lat można zaobserwować szybki rozwój tej gałęzi rynku. Kilka firm, takich jak Hantpol Biotechnologia i Ochrona Środowiska z Warszawy czy Trigger Wytwórnia Preparatów do Ochrony Środowiska w Tarnobrzegu, zajmuje się produkcją biopreparatów, koncentrując się na biotechnologicznych metodach oczyszczania ścieków, produkcji biopreparatów oraz namnażaniu szczepów bakterii [226]. Przykładem pionierskiego podejścia do problemu ochrony środowiska jest biopreparat Trigger [227], jedno z pierwszych polskich rozwiązań opartych na wykorzystaniu mikroorganizmów. Zawiera w swoim składzie bakterie, enzymy, aktywatory biologiczne, substancje pożytkujące, nośniki mineralne o rozwiniętej powierzchni oraz substancje stabilizujące. Stworzono go do biodegradacji różnorodnych odpadów organicznych, takich jak odpady roślinne, zwierzęce, papier, drewno, odchody czy ścieki [228].

Biopreparaty mają szereg zalet, takich jak niekorozyjność, bezpieczeństwo dla materiałów sztucznych i ceramiki oraz nieszkodliwość dla ludzi, zwierząt i roślin. Wykorzystuje się je m.in. w nieefektywnych oczyszczalniach ścieków, do przyspieszenia rozruchu nowych oczyszczalni, w przypadku niewłaściwej struktury kłaczków w osadzie czynnym, a także do przywracania równowagi na oczyszczalni po sytuacjach awaryjnych. Korzyści wynikające ze stosowania biopreparatów mikrobiologicznych do rekultywacji wód i ścieków obejmują m.in. szybką biodegradację substancji toksycznych, regenerację naturalnej flory bakteryjnej, poprawę jakości odprowadzanych ścieków, redukcję ilości nadmiernie gromadzących się osadów ściekowych oraz łatwość, szybkość i niskie koszty aplikacji.

6.2. Fizyczne metody dezynfekcji ścieków – promieniowanie ultrafioletowe UV

Drugą grupę metod wykorzystywanych do dezynfekcji ścieków stanowią procesy fizyczne, czyli: techniki membranowe, promieniowanie ultrafioletowe UV, procesy pasteryzacji czy termicznego suszenia, a także promieniowanie jonizujące, czyli tzw. dezynfekcja radiacyjna oraz ultradźwięki.

Proces dezynfekcji UV opiera się na reakcji fotochemicznej, która zachodzi w DNA i RNA mikroorganizmów pod wpływem promieniowania (dezaktywuje mikroorganizmy od wewnątrz, wpływając na ich materiał genetyczny [229]). DNA mikroorganizmów stanowi

kluczowy element decydujący o ich funkcjonowaniu i długości życia. Promieniowanie UV działa głównie poprzez zmiany w kwasach nukleinowych, zwłaszcza w nukleotydach DNA. Wytwarzane podczas ekspozycji na promieniowanie UV dimery tyminy i inne zmiany w strukturze DNA uniemożliwiają standardowy proces replikacji, co prowadzi do mutacji lub śmierci komórki. Stopień wrażliwości mikroorganizmów zależy od różnych czynników, takich jak rodzaj, wiek, wielkość mikroorganizmów, ich stan fizjologiczny, warunki środowiskowe oraz forma mikroorganizmu. Przykładowo do unieszkodliwienia bakterii i wirusów potrzebna jest mniejsza dawka promieniowania w porównaniu do pleśni i drożdży, a ponadto formy zarodnikowe są trwalsze niż formy wegetatywne [230]. Dodatkowo promieniowanie UV ma pośredni wpływ na bakterie, tworząc toksyczne związki w komórkach. W warunkach tlenowych promieniowanie UV-C działa najskuteczniej, podczas gdy obecność substancji obniżających potencjał oksydacyjno-redukujący zmniejsza jego wpływ [231]. W kontekście skuteczności działania fizyczno-chemicznych procesów dezynfekcji ścieków Olańczuk-Neyman i in.[232] twierdzą, że: „inaktywacja mikroorganizmów zależy od: typu mikroorganizmu i jego oporności na środek chemiczny, charakterystyki fizykochemicznej środowiska oraz od typu dezynfektanta i sposobu jego działania. Najbardziej wrażliwe na stosowane do dezynfekcji środki chemiczne są bakterie w postaci wegetatywnej, bardziej odporne są wirusy jelitowe i bakterie tworzące przetrwalniki, a największą oporność wykazują oocysty (np. *Cryptosporidium parvum*), cysty (*Giardia lamblia*), przetrwalniki (*Clostridium perfringens*), bakterie kwasoodporne (np. *Mycobacterium spp.*) a ponadto jaja helmintów (*Ascaris lumbricoides*). Skuteczność dezynfekcji mogą obniżyć podwyższone stężenia różnorodnych fizycznych i chemicznych zanieczyszczeń ścieków, jak np. zawiesina, rozpuszczone substancje organiczne i jony nieorganiczne”. Należy również zwrócić uwagę m.in. na bakterie odporne na środki przeciwdrobnoustrojowe (antybiotykooporność), które stanowią nowe wyzwanie w procesach oczyszczania i dezynfekowania ścieków. Badania pokazują, że sposób ich skutecznej eliminacji nie jest jeszcze dokładnie poznany i może wymagać zastosowania metod łączonych np. promieniowania UV z chlorem [233].

Promieniowanie ultrafioletowe (UV) jest promieniowaniem elektromagnetycznym o długości fal od 100 do 400 nm. Jak zauważa A. Niemczykowska i in. [234], wyróżnia się dwa podziały pasm UV: techniczne (daleki ultrafiolet obejmujący promieniowanie z zakresu od 100 do 200 nm i bliski ultrafiolet z zakresu od 200 do 300 nm) oraz ze względu na oddziaływanie: krótkie (UV-C, 200-280 nm), średnie (UV-B, 280-315 nm) i długie (UV-A, 315-400 nm) [235,236]. Pasma krótkie, szczególnie UV-C w zakresie od 200 do 280 nm, jest najbardziej niebezpieczne dla organizmów żywych i stanowi najskuteczniejszą metodę

dezynfekcji. Przenika ono przez ścianki komórkowe mikroorganizmów, powodując trwałe uszkodzenia struktury ich DNA. Skutkuje to niezdolnością do reprodukcji, co z kolei prowadzi do całkowitej eliminacji patogenów, zależnej od czasu i natężenia promieniowania UV [235]. Ekspozycja na promieniowanie ultrafioletowe o długości fali od 254 do 265 nm wywołuje szybką reakcję fotochemiczną, która prowadzi do eliminacji mikroorganizmów lub utraty ich zdolności reprodukcyjnych [35]. Długość fali 254 nm jest szczególnie skuteczna w eliminacji mikroorganizmów [237] a najsilniejsze działanie bakteriobójcze wykazuje promieniowanie o długości fali równej 260 nm [238]. Tradycyjna aparatura składa się z lamp rtęciowych z falą ciągłą, pracujących w formacie niskociśnieniowym (monochromatycznym przy 253,7nm) lub średniociśnieniowym (polichromatycznym w zakresie UV i światła widzialnego) [239]. Ekspozycja na promieniowanie UV-C powoduje szereg zmian w kwasach nukleinowych mikroorganizmów, takich jak rozrywanie łańcucha RNA lub DNA, denaturacja białek, powstawanie dimerów pirymidyny. Te zmiany zniekształcają strukturę nici DNA, utrudniając jej odtworzenie się, co prowadzi do ich śmierci lub utraty zdolności reprodukcyjnych [240]. Promieniowanie to powoduje również tworzenie wiązań pomiędzy DNA a białkami, krzyżowe połączenia między dwiema nićmi DNA, a także powstawanie letalnych dla komórek dimerów pomiędzy resztami tyminy w tej samej nici DNA [236].

Aby przeciwdziałać szkodliwemu działaniu promieniowania, bakterie rozwinęły mechanizmy reperacji uszkodzonego materiału genetycznego. Wyróżnia się reperację ciemną oraz reparację świetlną, znaną również jako fotoaktywacja, która ma miejsce w trakcie naświetlania światłem widzialnym (występuje m.in. u bakterii *coli*) [241,234]. Fotoreaktywacja jest aktywowana przez enzym fotoliazowy w obecności światła widzialnego o długości fali $\lambda = 370$ nm. Energia fotonów światła ($h\nu$) inicjuje rozszczepienie dimerów, co skutkuje przekształceniem cząsteczek DNA. Mechanizm fotoreaktywacji zachodzi, gdy enzymy rekonstruuja uszkodzoną strukturę DNA, spowodowaną promieniowaniem UV. Warto zauważyć, że obecność enzymów komórkowych istotnie wpływa na efektywność procesu dezynfekcji UV. Dlatego też istotne jest zniszczenie tych enzymów, co można osiągnąć, jak podają niektóre dane literaturowe, poprzez użycie promieniowania ultrafioletowego o długości fali 280 nm. Warto podkreślić, że promieniowanie UV o długości fali 254 nm nie posiada takiej zdolności, co oznacza, że niskociśnieniowe lampy UV emitujące światło o długości fali 254 nm mają ograniczone możliwości dezynfekcyjne, ponieważ nie są w stanie niszczyć ww. enzymów. Po dokonanej naprawie mikroorganizmy odzyskują zdolność do replikacji i infekowania gospodarza, tak jak przed inaktywacją spowodowaną przez promieniowanie UV [230]. Udowodniono, że organizmy reagujące na fotoreaktywację wymagają 2,2 razy więcej

promieniowania UV do osiągnięcia 90% dezaktywacji w porównaniu do tych, które nie podlegają temu procesowi [230]. Zjawisko fotoregeneracji jest niekorzystne, zwłaszcza w kontekście odprowadzania ścieków do odbiornika wód zanieczyszczonych związkami organicznymi. Dowiedziono, że obecność resztkowego BZT w oczyszczonych i zdezynfekowanych ściekach sprzyja ponownemu wzrostowi populacji bakterii w korzystnych warunkach środowiskowych.

Proces ciemnej naprawy stanowi znacznie wolniejszą formę odbudowy mikroorganizmów niż fotoreaktywacja. Polega on na identyfikacji oraz wycięciu uszkodzonych fragmentów DNA, a następnie na ich zastąpieniu nowymi fragmentami. Dominującą formą mechanizmu naprawy w ciemności jest proces fizycznego nacięcia (wycięcia) dimerycznych uszkodzeń nici DNA przez kompleks enzymatyczny. Nadal pozostaje niejasne, jakie dokładnie mechanizmy przeważają w procesie odbudowy komórek [242].

Hancock i Davis [243] proponują zupełnie inny mechanizm odrastania komórek. W swoich badaniach zaobserwowali, że rozwiłtki występujące w osadnikach wtórnych połykały bakterie z grupy *coli*, chroniąc je przed promieniowaniem UV w dalszym procesie dezynfekcji. Gdy gatunki dafni umierają, w kolejnych etapach procesu uwolnione bakterie mogą regenerować się i odbudowywać populację [230].

Technologia oczyszczania ścieków wykorzystuje głównie lampy UV-C. Dawka energii pochłonięta przez mikroorganizmy i czas ekspozycji to dwa ważne czynniki decydujące o powodzeniu dezynfekcji UV. Jeśli ilości tych dwóch czynników nie jest wystarczająca, ponowny wzrost mikroorganizmów może się powtórzyć. Zespół Somnath i Basu zauważył gwałtowny wzrost stężenia bakterii z grupy *coli* i stosunku bakterii z grupy *coli* do bakterii ogółem między 24 a 48 godziną po zastosowaniu promieniowania UV, w porównaniu do stanu tuż po jego zastosowaniu. Tempo wzrostu stopniowo malało między 72 a 144 godziną. Podobne trendy obserwowane są w innych badaniach [230].

Stabilność mikrobiologiczna ścieków oczyszczonych po procesie dezynfekcji promieniowaniem UV odnosi się do utrzymania skuteczności działania dezynfekcji oraz minimalizacji odradzania się mikroorganizmów. Stabilność mikrobiologiczna jest istotnym aspektem jakości, ponieważ nawet po zakończeniu procesu dezynfekcji środowisko wodne może być nadal narażone na zanieczyszczenia biologiczne, jeśli populacja mikroorganizmów ponownie wzrośnie w wyniku np. przenoszenia się mikroorganizmów z innego źródła, np. zanieczyszczonej wody. Dlatego też należy monitorować stabilność mikrobiologiczną po zakończeniu procesu dezynfekcji UV. Aby zapewnić stabilność mikrobiologiczną, konieczne jest prawidłowe funkcjonowanie i konserwacja systemu dezynfekcji UV oraz utrzymanie

odpowiednich parametrów operacyjnych, takich jak czas naświetlania, intensywność promieniowania UV oraz przepływ wody. Choć monitorowanie stabilności mikrobiologicznej nie jest nowością (powszechnie stosuje się je w kontroli jakości wody przeznaczonej do spożycia, artykułów spożywczych itp.) praktyka tego typu w oczyszczalniach ścieków nie jest powszechna [244,245,246,247].

Zarówno intensywność, jak i dawka promieniowania mają znaczący wpływ na skuteczność eliminacji mikroorganizmów z oczyszczonych ścieków. W praktyce, podczas pracy reaktora UV, obserwowane są kluczowe parametry, takie jak przepływ, stan lampy i natężenie promieniowania. Metoda jest szczególnie efektywna, gdy stosuje się ją w przypadku odpowiednio oczyszczonych ścieków. Obecność cząstek stałych może obniżyć jej skuteczność – mogą zakłócać transmisję promieniowania UV poprzez pochłanianie lub rozpraszanie światła, a także adsorbowanie i/lub transportowanie bakterii, chroniąc je przed promieniowaniem świetlnym emitowanym przez lampy [248,249]. Zgodnie z ustaleniami naukowców [250] istnieje określona granica wielkości cząstek, poniżej której nie wpływają one negatywnie na działanie promieniowania UV – wynosi ona około 10 μm . Dlatego konieczne jest monitorowanie poziomu zmętnienia i zawiesin w oczyszczanych ściekach, aby zapewnić optymalną efektywność dezynfekcji UV [35]. Alternatywą mogłoby być zastosowanie dalszych procesów, takich jak np. ultradźwięki, z jednoczesnym wykorzystaniem promieniowania UV, co mogłoby zmniejszyć wielkość cząstek i utrzymać wysoką skuteczność dezynfekcji [251].

W ostatnich latach, aby zminimalizować słabości konwencjonalnego promieniowania UV i zwiększyć skuteczność dezynfekcji, badania koncentrują się różnych alternatywnych podejściach, jak chociażby impulsowe promieniowanie UV (PUV) i dioda elektroluminescencyjna UV (UV-LED) lub integracja promieniowania UV z technologiami nie chemicznymi takimi jak: sonofotoliza, fotokataliza, fotoelektrokataliza) [249,252].

6.3. Chemiczne metody dezynfekcji ścieków – ozonowanie

W chemicznych metodach dezynfekcji ścieków najczęściej wykorzystuje się chlor ze względu na jego skuteczność i niskie koszty. Przeprowadzone badania wskazują jednak, że bezchlorowe substancje reagują z substancjami organicznymi, tworząc niekorzystne produkty uboczne dezynfekcji (tzw. DBP) [253], w tym m.in. trihalometanów (THM), kwasów haloctowych (HAA), haloctonów (HK), halonitrometanów (HNM), haloacetonitrylów (HAN), nitrozoaminów (NA) itp. [254], które mają działanie rakotwórcze, mutagenne, genotoksyczne, cytotoksyczne i teratogenne.

Analizując chemiczne sposoby dezynfekcji ścieków, należy również zwrócić uwagę m.in. na: dezynfekcję ścieków z wykorzystaniem kwasu nadchlorowego czy nadmanganowego, a także na możliwość zastosowania alternatywnych metod dezynfekcji: np. metoda PEROXONE [35], środek dezynfekujący o nazwie CAC-717 (składający się z mezoskopowych kryształów wapnia wodoru węglanowego) czy wykorzystanie żelazianu (VI) (FeVIO_4 , Fe(VI)), będącego środkiem utleniająco-dezynfekującym, stosowanym do oczyszczania szerokiej gamy zanieczyszczeń w ściekach, w tym zanieczyszczeń mikrobiologicznych [255]. Ozonowanie w procesie oczyszczania ścieków stanowi pewną alternatywę dla powszechnie stosowanych chemicznych metod dezynfekcji ścieków.

Ozon (O_3) to alotropowa forma tlenu składająca się z trójatomowych cząsteczek. Jego silne właściwości aseptyczne i toksyczne sprawiają, że od lat jest stosowany do dezynfekcji wody i ścieków. Działanie ozonu jako środka dezynfekującego opiera się na jego zdolności do zwiększania przepuszczalności ścian i błon komórkowych poprzez ozonolizę [178], która wynika z podwójnych wiązań w lipidach (wpływ na bakterie jest zauważalny poprzez degradację ściany komórkowej, co prowadzi do lizy komórkowej z powodu utleniania protoplazmy). Kiedy cząsteczka ozonu rozpada się w miejscu podwójnego wiązania, między atomami węgla powstają krótsze łańcuchy, zabijające bakterie szybciej niż chlor. Peroksydacja wielonienasyconych kwasów tłuszczowych zachodzi pod wpływem ozonu, prowadząc do zmian w strukturze błony komórkowej. Odkrycie, że błona komórkowa zawiera około 10^6 podwójnych wiązań, wyjaśniło zdumiewającą skuteczność ozonu, przewyższającą inne środki dezynfekcyjne. Ozon istotnie wpływa na metabolizm komórkowy poprzez utlenianie koenzymów NADH i NADPH, kluczowych w reakcjach syntezy i rozkładu, takich jak oddychanie i synteza kwasów tłuszczowych. Jego skuteczność zależy również m.in. od szczepu bakterii – wykazuje niższą wrażliwość działania na bakterie Gram-ujemne niż na bakterie Gram-dodatnie [231, 250, 35].

Ozon, poprzez utlenianie arsenu, żelaza i manganu w wodzie, generuje nierozpuszczalne substancje, mogące być skutecznie usunięte poprzez proces filtracji, który tym samym eliminuje te zanieczyszczenia. Ponadto wykazuje zdolność do obniżania biologicznego zapotrzebowania na tlen (BZT) oraz chemicznego zapotrzebowania na tlen (ChZT), a także redukcji materiałów organicznych. Dodatkowo ozon ma możliwość niszczenia potencjalnie rakotwórczych związków, takich jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA). Może być także skuteczny w eliminowaniu uciążliwych zapachów oraz elementów refrakcyjnych, co wzmacnia jego wszechstronne zastosowanie w procesie oczyszczania środowiska [256].

Pomimo powszechnego zastosowania ozonu w dezynfekcji dokładny mechanizm jego działania nadal nie został do końca poznany. W kontekście dezynfekcji wirusowej rozważane są różne aspekty tego działania, takie jak atak oksydacyjny na białka ochronne pokryte ozonem, interakcje z kwasem dezoksyrybonukleinowym lub kwasem rybonukleinowym. Mimo że istnieją badania nad tym zagadnieniem [257,258,259], całkowity zakres działań ozonu w tym kontekście nie został jeszcze w pełni zdefiniowany. Inaktywacja drobnoustrojów związana z ozonowaniem zależy od wielu czynników środowiskowych, przykładowo:

- Temperatura – wpływa na szybkość rozpadu O_3 , prowadząc do powstania wysoce reaktywnych form, takich jak HO_2 i HO . Warto zauważyć, że O_3 jest mniej rozpuszczalny w wyższych temperaturach – rozpuszczalność ozonu w wodzie/ściekach maleje wraz ze wzrostem temperatury cieczy [260,256].
- Wilgotność względna oraz pH – stanowią istotne elementy skutecznego ozonowania. Wyższe pH sprzyja zaawansowanym procesom utleniania – prowadzi do rozpadu związku do wysoko reaktywnych form, jakimi są wolne rodniki (np. rodnik hydroksylowy $^{\circ}OH$) [261,262,263]. Badania wskazują, że wzrost wilgotności wzmacnia inaktywację bakterii [264].
- Czas kontaktu, rodzaj organizmu, dawkowanie i zapotrzebowanie na ozon są kluczowymi czynnikami wpływającymi na skuteczność ozonowania [265]. Natomiast zmętnienie, obecność substancji organicznych i innych dodatków, dodatkowo mogą komplikować ten proces [256].
- Wartość potencjału redoks również odgrywa istotną rolę w hierarchizacji sił utleniania substancji (wartość potencjału dla ozonu w środowisku kwaśnym wynosi 2,07V; dla porównania wartości potencjału dla ditlenku chloru wynosi 1,71V, a dla tlenu 1,23V) [266].
- Nadtlenek wodoru (H_2O_2) jest ważny jako inicjator i promotor rozkładu ozonu. Jeśli stężenie H_2O_2 jest zbyt wysokie, może jednak hamować rozkład ozonu, ograniczając reakcję między nim a ozonem. Substancje i jony, takie jak alkohol tertbutylowy, jony węglanowe, wodorowęglanowe oraz substancje humusowe, działają jako inhibitory reakcji rozkładu ozonu, neutralizując wolne rodniki [267,268,266].
- Skuteczność inaktywacji bakterii zależy dodatkowo od składu społeczności bakteryjnej, obejmującego wielkość, kształt i skład błony komórkowej. Kwestionuje się przekonanie, że wyniki uzyskane dla bakterii hodowanych w warunkach laboratoryjnych można bezpośrednio przenieść na autochtoniczne zbiorowiska bakterii w wodzie pitnej lub

ściekach, z uwagi na różnorodność ich właściwości fizycznych, chemicznych i biologicznych [269,256].

Podstawowe czynniki tj. dawka ozonu, czas kontaktu czy warunki środowiskowe warunkują prawidłowy monitoring i kontrolę jakości zastosowanego procesu. Stabilność mikrobiologiczna odnosi się do utrzymania efektywności dezynfekcji w dłuższym czasie oraz minimalizacji ryzyka ponownego zanieczyszczenia wody [270]. Stabilność mikrobiologiczna ścieków oczyszczonych po procesie dezynfekcji ozonem jest kluczowym zagadnieniem w ocenie skuteczności dezynfekcji oraz w zapewnieniu bezpieczeństwa zdrowotnego. Nie zawsze jest jednak rutynowo przeprowadzana w praktyce, m.in. przez brak standardowych procedur, kosztowność i czasochłonność czy brak wymogów regulacyjnych.

Z uwagi na swoją budowę chemiczną ozon w środowisku wodnym może reagować z różnymi substancjami według trzech zasadniczych mechanizmów: reakcji utleniania i redukcji, reakcji cykloaddycji oraz reakcji podstawiania elektrofilowego. Podczas tych reakcji możliwe jest powstawanie wolnych rodników. W efekcie wyróżnia się dwa typy reakcji ozonu w środowisku wodnym:

- reakcje bezpośredniego działania ozonu cząsteczkowego – wysoce selektywne; ograniczają się wyłącznie do nienasyconych związków alifatycznych, aromatycznych oraz aminowych; powstałe produkty są bardzo nietrwałe i przekształcają się w łatwo biodegradowalne związki karbonylowe [271];
- reakcje pośrednie – występują w nich wtórne produkty utleniania (rodniki hydroksylowe HO i hydroksynadtlenkowe HO₂), towarzyszące rozpadowi ozonu w wodzie [266]; są silnymi utleniaczami (drugi najwyższy potencjał utleniania po fluorze, przy 2,86 V); mniej selektywne.

W typowych warunkach wodnych, w tym w ściekach, zarówno reakcje bezpośrednie, jak i pośrednie będą przebiegać jednocześnie, a udział reakcji pośrednich (poprzez atak rodników) będzie wzrastać wraz ze wzrostem pH. Stopień reakcji rodnikowej, zależy jednak w dużej mierze od jakości wody/ścieków, a w szczególności od obecności gatunków wychwytyjących lub hamujących oraz zasadowości [272].

Praktyka pokazuje, że ozon jest ponad dwukrotnie skuteczniejszy niż chlor w eliminacji mikroorganizmów. W Polsce dezynfekcja ścieków miejskich przy użyciu ozonu nie jest powszechna z powodu kosztów, jednak wraz z postępem technologicznym można spodziewać się, że sytuacja ta ulegnie zmianie, a ozon stanie się bardziej opłacalny. Należy pamiętać, że

ponieważ ozon jest bardziej reaktywny niż chlor, w wyniku ozonowania również powstają produkty uboczne dezynfekcji. Do ubocznych produktów ozonowania wody powierzchniowej zaliczymy aldehydy takie jak m.in. formaldehyd (jest jedynym produktem ubocznym dezynfekcji sklasyfikowanym przez Światową Organizację Zdrowia jako ludzki czynnik rakotwórczy należący do grupy 1 [273]), acetaldehyd, pentanol czy gliksal; ketony, kwasy karboksylowe oraz inne produkty, jak np. benzoacetonitryl [274]. Inni naukowcy badający szkodliwość produktów ubocznych powstających podczas dezynfekcji ścieków ozonem wskazali również bromiany i N-nitrozodimetyloaminy, które okazały się rakotwórcze, neurotoksyczne oraz mutagenne [273]. Ponadto ozonowanie prowadzi do powstawania biodegradowalnych produktów, ułatwiających rozwój bakterii, przez co ta metoda nie jest zalecana jako ostatni etap dezynfekcji np. sieci wodociągowych [275].

7. Metody oznaczania mikroorganizmów

7.1. Oznaczenia mikrobiologiczne metodami hodowlanymi

We wszystkich rodzajach wód w środowisku naturalnym występują różnorodne mikroorganizmy, w tym heterotroficzne bakterie i grzyby (pleśnie i drożdże). Oznaczenie ogólnej liczby mikroorganizmów w wodzie (określanych również jako liczba bakterii heterotroficznych, całkowita liczba bakterii, liczba kolonii) jest jednym z parametrów mikrobiologicznych, który dostarcza niezbędnych informacji do nadzoru i oceny jakości wody [276].

Mikroorganizmy, które są zdolne do przeżycia i namnażania się w wodzie, w warunkach laboratoryjnych rosną lepiej w 22° C niż w wyższych temperaturach, tym samym charakteryzują dane środowisko i mogą odzwierciedlać warunki właściwe dla danej pory roku. W przeciwieństwie do nich mikroorganizmy, rosnące w temperaturze 36° C, na ogół krócej przeżywają w środowisku naturalnym i istnieje większe prawdopodobieństwo, że pochodzą z obcych źródeł oraz mogą mieć znaczenie sanitarne.

W przypadku liczby bakterii heterotroficznych oznaczanej w temperaturze 22±2°C wykrywane są przede wszystkim bakterie stanowiące mikroflorę autochtoniczną wody, które nie mają istotnego znaczenia sanitarnego, gdyż brak im zdolności wzrostu w temperaturze ciała ludzkiego (37° C), a zatem zazwyczaj są nieszkodliwe dla zdrowia człowieka. Należy jednak pamiętać, że populacja mikroorganizmów heterotroficznych występujących w wodzie obejmuje szeroki zakres rodzajów, w tym *Acinetobacter spp.*, *Aeromonas spp.*, *Alcaligenes spp.*, *Comamonas spp.*, *Enterobacter spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Klebsiella spp.*, *Moraxella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Shingomonas spp.*, *Stenotrophomonas spp.* Mikroorganizmy te są rozpowszechnione w środowisku, a organizm człowieka styka się z nimi nieprzerwanie i narażony jest na kontakt ze znacznie większą ich liczbą niż poprzez spożywaną wodę, np. przyjmując je wraz z jedzeniem. Generalnie nie stanowią one zagrożenia dla zdrowia ludzi, jednak niektóre z nich mogą być patogenami oportunistycznymi. Mianem tym określa się mikroorganizmy, które nie stanowią zagrożenia dla osób zdrowych, mogą natomiast stawać się przyczyną zachorowań w szczególnych warunkach, u osób z upośledzeniem odporności różnego pochodzenia, pacjentów przebywających w szpitalach na oddziałach intensywnej opieki czy salach pooperacyjnych. Ponadto wykazano, że wysokie wartości ogólnej liczby mikroorganizmów namnażających się w 22° C, mogą zaburzać wynik analiz mikrobiologicznych w kierunku *E. coli*.

W przypadku badań prowadzonych w temperaturze inkubacji $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ wykrywane są m.in. bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*, w tym: *Proteus* i *Serratia* oraz bakterie grupy *coli*: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella* czy *E. coli*. Spośród innych bakterii można wymienić pałeczki z rodzaju *Aeromonas*, *Pseudomonas* (*P. cepacia*, *P. fluorescens*, *P. maltophilia*), bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, *Enterococcus faecalis*. Ze względu na wykrywane rodzaje bakterii prowadzenie badań w temperaturze $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ może być źródłem informacji co do potencjalnego zanieczyszczenia wody ściekami lub drobnoustrojami pochodzenia jelitowego.

7.2. Szybkie metody oznaczania mikroorganizmów

7.2.1. Luminometria ATP

Luminometria opiera się na reakcji hydrolizy ATP do ADP i ortofosforanu lub do AMP i pirofosforanu, co prowadzi do uwalniania określonej ilości energii swobodnej, którą można mierzyć jako emisję kwantów światła. Ten proces nazywany jest chemoluminescencją, a gdy zachodzi pod wpływem enzymów – bioluminescencją. Bioluminescencja polega na enzymatycznym utlenianiu określonego substratu, jakim jest lucyferyna (L), do jej utlenionej formy (E:LO*), charakteryzującej się podwyższonym poziomem energii. Następnie kompleks E:LO powraca do stanu energetycznego emitując energię w postaci światła [277]. Jakikolwiek ślad ATP wskazuje na obecność materii organicznej, w tym bakterii [278]. Dzięki specjalnemu, wysokoenergetycznemu wiązaniu, którym są połączone, możliwe jest wydobywanie się potrzebnej energii. Zawsze gdy dochodzi do ich rozpadu, odłączana jest jedna reszta fosforanowa. Na skutek takiej przemiany otrzymujemy związek ADP – adenozyndifosforan [277]. Z niego ponownie powstaje ATP, ale najpierw musi zajść odpowiednia reakcja, czyli fosforylacja. ATP jest dobrym markerem żywych komórek, gdyż jego cząsteczki są produktem metabolizmu komórkowego. Wraz z obumarciem komórki synteza ATP zostaje zahamowana, a istniejące cząsteczki są rozkładane przez wewnątrzkomórkowe enzymy ATP-aze i fosfatazy. Poziom ATP zależy od rodzaju drobnoustrojów oraz stanu fizjologicznego komórek. Podczas procesów dezynfekcji dochodzi do uszkodzenia bakterii, w wyniku czego zostaje przerwana ciągłość błony cytoplazmatycznej, a ATP jest uwalniane na zewnątrz, przez co zwiększa się wartość zewnątrzkomórkowego ATP.

Ilościowe oznaczenie zanieczyszczeń z wykorzystaniem luminometrii działającej poprzez bioluminescencję odbywa się w drodze reakcji katalizowanej przez lucyferazę (na skutek reakcji enzymatycznej lucyferyny z lucyferazą, której przebieg jest uzależniony od obecności

jonów Mg^{2+} oraz ATP jako kofaktora, powstaje oksylucyferyna), gdzie po aktywacji przez O_2 i ATP następuje hydroliza ATP, powodując emisję światła. Emisja fotonów światła następuje w wyniku przejścia oksylucyferyny ze wzbudzonego stanu elektronowego do podstawowego. Luminometr wykrywa i mierzy natężenie światła emitowanego proporcjonalnie do ilości ATP – ilość ATP jest wprost proporcjonalna do emitowanej ilości światła (wyrażanej w jednostkach porównawczych Relative Light Units [RLU]) [279]. W praktyce oznacza to, że odczytywana wartość RLU jest wprost proporcjonalna do ilości potencjalnie aktywnych jednostek tworzących kolonie mikroorganizmów na badanej powierzchni. Na tej podstawie formułuje się wnioski dotyczące „czystości mikrobiologicznej” [280]. Badania wskazują, że luminometria może znaleźć zastosowanie także w identyfikacji czynników biologicznych [278,281,282].

W dziedzinach środowiskowych, w tym przede wszystkim w kontekście oczyszczania ścieków, analiza ATP może być wykorzystywana m.in.:

- jako narzędzie do monitorowania jakości (ilościowe określanie zawartości drobnoustrojów) wody i ścieków po dezynfekcji promieniowaniem ultrafioletowym (UV) i chlorem [283,284,285,286];
- do oceny jakości mikrobiologicznej wód: powierzchniowych, deszczowych, gruntowych i wodociągowych [287];
- do bezpośredniej oceny wpływu substancji toksycznych na zbiorowiska drobnoustrojów w układzie osadu czynnego [288,289];
- w celu wykrycia przedostawania się drobnoustrojów pochodzących ze ścieków i wód powierzchniowych do wody pitnej [290].

7.2.2. Cytometria przepływowa FCM

Przyjmuje się, że cytometria przepływowa (z ang. *Flow cytometry* – FCM) została opracowana wraz z wynalezieniem sortownika komórek przez Fulwylera [291] w 1965 roku. Także kilka innych technologicznych odkryć miało wpływ na kształt, jaki FCM przybrało obecnie. Mowa tu m.in. o wczesnych pracach Moldavana [292], który zaprojektował mały licznik ogni, o urządzeniu opartym na fotopowielaczu do zliczania cząstek, stworzonym przez zespół Guckera i O'Konskiego [293], jak również o koncepcji ogniskowania hydrodynamicznego przypisywanej Croslandowi-Taylorowi [294], a także o liczniku Coulter [295] czy narzędziach do analizy pojedynczych komórek Kamensky'ego i in. [296,297,298]. Na ewolucję cytometrii przepływowej wpływał nie tylko sprzęt – było to unikalne połączenie

techniki, rozwoju nauki i technologii ostatnich kilku dekad XX wieku. Krytycznym osiągnięciem okazało się zastosowanie fluoresceiny sprzężonej z przeciwciałem – antracyną czy fluoresceiną [299,300]. Duży wpływ na rozwój cytometrii przepływowej miały badania Hulett i in., którzy połączyli przepływ i fluorescencję [301]. Ci wybitni naukowcy stworzyli podstawę dla technologii przepływu, która dojrzała do pełnego zintegrowania z codziennymi środowiskami pracy klinicystów i badaczy na całym świecie [298].

Ze względu na możliwość analizy jedynie stosunkowo dużych cząstek, niespecyficzne wiązanie barwników fluorescencyjnych oraz słabą i skomplikowaną zdolność obliczeniową, początkowe zastosowania FCM były ograniczone [302]. Przez długie lata metody cytometryczne na większą skalę stosowano jedynie w analizach medycznych i rutynowej diagnostyce, np. w rozpoznaniu i leczeniu białaczek i chłoniaków [303] czy nowotworów krwi [304]. Ostatnie dziesięciolecia pozwoliły na opracowanie tańszego, a zarazem skuteczniejszego oprzyrządowania, które w połączeniu z pojawieniem się nowych technik analitycznych umożliwiło wykorzystanie cytometrii w wielu nowych dziedzinach. Stopniowo cytometria zaczęła być stosowana w weterynarii, biotechnologii przemysłowej, kontroli jakości żywności i farmaceutyków. Następnie podjęto próbę adaptacji cytometrii do monitoringu systemów uzdatniania wody pitnej. Kolejne lata zaowocowały ulepszeniem metodyki, pozwalającym na skrócenie czasu pracy w analizach ścieków zarówno oczyszczonych i odprowadzanych do odbiorników, jak i surowych czy w osadzie czynnym. Rozwój badań cytometrycznych pozwolił na szybką i skuteczną analizę ekologicznych badań mikrobiologicznych naturalnych siedlisk wodnych, a ponadto gleb [304,305]. Dlatego też możliwość wykorzystania cytometrii przepływowej w analizie mikrobiologicznej wód środowiskowych, w tym ścieków, zasługuje na szczególną uwagę.

FCM należy do szybkich technik oznaczania opartych na fluorescencji, skupiającej się na bezpośrednim pomiarze rodzimych bakterii lub ich aktywności enzymatycznej [306]. Cytometria przepływowa jest specjalistyczną techniką badawczą, pozwalającą na analizę pojedynczych cząstek zawieszonych w roztworze [307]. Do takich cząstek należą bakterie, pierwotniaki, wirusy, fragmenty komórek, szczątki nieorganiczne itp. Poddawane analizie cząstki, zawieszone w strumieniu płynu osłonowego, przepływają przez mikrokanal pojedynczo: jedna za drugą (tzw. liniowy przepływ cząstek). Proces, w którym płyn osłaniający płynie szybciej niż centralny strumień analizowanej zawiesiny, przez co badane cząstki formują się w cylindryczny strumień o szerokości jednej np. komórki, nazywamy ogniskowaniem hydrodynamicznym [307]. To właśnie ogniskowanie hydrodynamiczne, stanowiące podstawę działania cytometrii przepływowej, powoduje, że cząstki przepuszczane są pojedynczo na

zasadzie *cell by cell*, co z kolei, dzięki pomiarowi światła rozproszonego lasera (FSC i SSC) oraz intensywności światła fluorescencji, pozwala na rozróżnienie badanej populacji komórek, przykładowo według ich cech morfologicznych czy składu antygenowego [303].

Wykorzystywanym światłem wzbudzonym jest zazwyczaj wiązka lasera [308]. Jak wyjaśniają Hammes i Egli [304]: „oddziaływanie między wiązką światła, a cząsteczką powoduje specyficzne rozpraszanie światła i wzbudzanie fluorochromów. Światło rozproszone i emitowane światło fluorescencyjne są następnie wykrywane i mierzone za pomocą fotopowielaczy”. Rozproszenie światła może być czołowe, czyli wykrywane pod małym kątem, znane jako FS (ang. *forward scatter*), które wiąże się z informacją o wielkości danej cząstki, jak również boczne, pod dużym kątem – SSC (ang. *side scatter*), informujące o złożoności cząstki i pozwalające uzyskać jej bardziej szczegółową charakterystykę.

Fluorescencja występuje, gdy pewne cząsteczki zaczynają emitować światło po wzbudzeniu przez wiązkę odpowiedniej długości fali. Dlatego też wykrywa się je pod dużym kątem, po selekcji za pomocą odpowiednich filtrów optycznych [309,304]. Większość komórek ma pewną naturalną autofluorescencję [309]. Z jednej strony bywa ona pomocna, ponieważ można ją z pożytkiem wykorzystać do analizy, z drugiej jednak może zaciemniać sygnały fluorescencyjne będące przedmiotem zainteresowania badacza. Dlatego też w celu wykrywania i pomiaru natężenia, z jakim występują specyficzne cechy komórek, standardową praktyką jest stosowanie tzw. barwników fluorescencyjnych, czyli fluorochromów [309]. Dwa barwniki/ fluorochromy powszechnie wykorzystywane w analizie FCM to SYBR® Green I (SGI) i jodek propidyny (PI). SGI mierzy całkowite stężenie komórek (TCC) niezależnie od żywotności komórek lub możliwości hodowli, natomiast mierzy uszkodzenie błony komórkowej, ponieważ normalnie nie jest obecny w komórkach z nienaruszonymi błonami cytoplazmatycznymi, ale dyfunduje przez komórki z poważnym uszkodzeniem błony [310]. Stężenie nienaruszonych komórek (ICC) bez uszkodzenia błony komórkowej wykryte przez barwienie PI jest uważane za wskaźnik inaktywacji komórek [311].

Głównymi zaletami FCM są:

- szybkość analizy (mniej niż 3 min na próbkę);
- dokładność (mniej niż 5% błąd aparatury);
- czułość (detekcja już na poziomie 100 komórek na mililitr);
- kompatybilność z różnymi metodami barwienia i znakowania;
- łatwość obsługi i znaczny potencjał automatyzacji;

- możliwość pomiaru cech komórkowych oraz możliwość bezwzględnego zliczenia badanych komórek;
- grupowanie oznaczonych cząstek, a następnie ich podział na poszczególne populacje m.in. według ich wielkości; tym samym analiza FCM jest przydatna nie tylko do pomiaru bakterii, lecz również komórek drożdży, alg, pierwotniaków czy wirusów znajdujących się w środowiskach wodnych [312];
- walorem przemawiającym za wykorzystywaniem FCM w próbach środowiskowych jest również możliwość analizowania komórek z wykorzystaniem ich naturalnej fluorescencji. Uzyskane dane, dotyczące rozproszenia i fluorescencji, pozwalają na charakterystykę komórek pod względem wspomnianej już wielkości oraz złożoności i zawartości kwasów nukleinowych, dzięki czemu stanowi niejako unikalny – cytometryczny „odcisk palca” społeczności drobnoustrojów obecnych w próbce wody [313]. Jak zauważa Forster i in., umiejętności identyfikowania, wyliczania i monitorowania funkcji metabolicznych subpopulacji w obrębie złożonych społeczności bakteryjnych żyjących w ściekach, mogą być skutecznie identyfikowane właśnie za pomocą FCM [314],
- analizy cytometryczne mogą być z powodzeniem wykorzystywane do specyficznej identyfikacji komórek docelowych, pod warunkiem, że są one obecne w wystarczająco wysokim stężeniu i możliwe jest ich wybarwienie za pomocą zastosowanego barwnika [309].

Jednocześnie należy pamiętać, że cytometryczne analizy środowiskowe związane są ze scharakteryzowanymi poniżej trudnościami:

- Uzyskanie niewiarygodnych wyników (zliczeń) z uwagi na zawarte w wodach duże ilości cząstek nie komórkowych;
- Próbki o nieorganicznym zmętnieniu (np. ekstrakty gleby lub osadów) często wymagają specjalnej obróbki wstępnej (np. filtracji, wirowania, sonikacji, homogenizacji [309]) przed wykonaniem analizy, a następnie dobrania właściwych technik barwienia oraz ewentualnie sortowania; analizy mocno mętnych prób wiążą się z realnym ryzykiem zanieczyszczenia cytometru, w związku z czym po każdej analizie zalecane jest długie czyszczenie poprzez płukanie cytometru z uwzględnieniem częstych zmian prędkości przepływu. Jak wskazuje H.R. Safford i in. [309]: „największym wyzwaniem w stosowaniu cytometrii w badaniu prób środowiskowych w tym ścieków (oczyszczonych jak również surowych czy osadu

czynnego) jest wysoka zawartość obciążeń (cząstek), które stanowią realne niebezpieczeństwo zatkania cytometru lub fałszowania wyników poprzez np. sklejanie się ze sobą dwóch lub więcej cząstek. Zatem w przypadku analizy prób mętnych, jak np. ścieki surowe czy osad, odpowiednie przygotowanie badanej próbki może być kluczowe w zmniejszeniu prawdopodobieństwa zatkania lub zlepiania cząstek podczas aplikacji FCM”;

- W analizowanej zawieszynie, przede wszystkim w przypadku prób środowiskowych, poza badaną populacją komórek znajdują się również różnego rodzaju zanieczyszczenia, np. szczątki uszkodzonych komórek czy swobodne cząstki barwników. Zwykle są one mniejsze od badanych komórek, dzięki czemu, aby ograniczyć ich wpływ na wyniki pomiarów, trzeba odpowiednio wyregulować wartość progową intensywności FS. Niekiedy niewielkie obiekty nadal przepływają jednak przez komorę pomiarową i mogą wpływać na jakość obrazu [307];
- Próby z dużą ilością zanieczyszczeń wiążą się z koniecznością ich przygotowania w stosunkowo dużym rozcieńczeniu (10^{-2} lub czasem nawet 10^{-3} lub 10^{-4}), co również może przekładać się na dokładność uzyskanych wyników;
- Ukazane na obrazie rozproszenie wskazuje jedynie na względny, a nie bezwzględny rozmiar prezentowanych cząstek. Intensywność sygnałów rozproszonych zależy od takich czynników jak długość fali lasera, kąt zbierania, chropowatość powierzchni, współczynnik załamania cząstek i płynu osłonowego. Dlatego też cząstka generująca dwukrotnie większy sygnał FSC niż inne cząstki niekoniecznie jest od nich dwa razy większa. Ponadto większość znajdujących się w badanej cieczy cząstek ma nieregularny kształt, co oznacza, że intensywność sygnału zależy od orientacji/ułożenia cząstki w momencie osiągnięcia punktu „styku” z laserem [308];
- Samo rozróżnienie komórek na żywe i martwe lub uszkodzone może przysporzyć badaczowi sporo trudności [309,305,315,316,136].

Bakteryjny rozkład zanieczyszczeń stosowany w biologicznych procesach oczyszczania ścieków ułatwia bezpieczne ich usuwanie do odbiorników wodnych. Biorąc pod uwagę, jak istotna jest wysoka skuteczność działania wspomnianych procesów, badania skupiają się na poszukiwaniu metod szybkiej i skutecznej identyfikacji kluczowych gatunków mikroorganizmów, na których opierają się procesy oczyszczania [314]. Choć cytometria

przepływowa jest charakteryzowana jako metoda analizy pojedynczych komórek i z założenia nie jest przeznaczona do złożonej analizy makrocząsteczkowej, może okazać się bardzo dużą pomocą w analizie różnego rodzaju biofilmów lub kłaczków osadu czynnego [304]. Metodę cytometrii przepływowej zastosowano m.in. w celu oceny całkowitej liczby drobnoustrojów obecnych w badanych próbkach [24]. Wykorzystano fakt, że FCM umożliwia ilościową, wieloparametryczną analizę wykrytych cząstek, w tym intensywności ich fluorescencji, rozproszenie światła czy właśnie zliczenie obecnych w próbce cząstek. Ponadto skorzystano z funkcji oprogramowania FCM pozwalającego na określenie i analizę konkretnego obszaru np. oddzielenie skupisk bakterii od tła w procesie tzw. „bramkowania” [304]. Analiza cytometrii przepływowej z użyciem barwnika PI i/lub barwnika SYTO lub SYBR jest także stosowana w celu oceny wpływu dezynfekcji na integralność błony komórkowej (skuteczność dezynfekcji) w tym m.in. w:

- w celu zbadania wpływu ozonowania na cysty *Giardia lamblia* [317];
- w celu zbadania wpływu wolnego chloru na *Burkholderia pseudomallei* [318];
- w celu oceny wpływu dezynfekcji słonecznej na *Salmonella typhimurium* i *Shigella flexneri* [319];
- w celu zbadania wpływu promieniowania słonecznego na wiele szczepów *Vibrio cholerae* [320];
- w celu zbadania wpływu chloru na *Enterococcus faecalis* [321];
- w celu zbadania wpływu chloru na *Microcystis* [322,323];
- w celu zbadania wpływu chloru, chloraminy i promieniowania ultrafioletowego (UV) na *S. aureus*. Nie i in. [324] zaobserwowali, że dezynfekcja UV dezaktywuje komórki bez wpływu na integralność błony, dzięki czemu straty spowodowane promieniowaniem UV są trudniejsze do wykrycia za pomocą FCM;
- do badania wpływu dezynfekcji na określone patogeny. Na przykład Tang i in. [325] wykorzystali mikrosfery fluorescencyjne do modelowania inaktywacji oocyst *C. parvum* przez ozonowanie, zauważając, że utrata intensywności fluorescencji mikrosfer jako dobry substytut strat spowodowanych dezynfekcją;
- Heselgrave i Kilvington [326] wykorzystali dane dotyczące rozproszenia oraz dane autofluorescencji i barwienia PI do oceny wpływu dezynfekcji słonecznej na żywotność *Giardia*, *Entamoeba invadens* i *C. parvum*.

Analizy cytometryczne mogą być również z powodzeniem stosowane do oceny ścieków oczyszczonych. Na przestrzeni lat m.in. w badaniach Bricheux i in., [327]; Yang i in., [328];

Harry i in., [329]; Vivas i in., [330] FCM był wykorzystywany do oceny toksyczności – wpływu ścieków odprowadzanych do wód. Metody cytometryczne w analizie ścieków zostały również użyte do identyfikacji bakterii gromadzących fosforany w celu ulepszenia systemów biologicznego usuwania fosforu. Analiza FCM przyczyniła się do zidentyfikowania nowych bakterii mogących odgrywać rolę organizmów akumulujących fosforany i mieć duży wpływ na przebieg procesów oczyszczania ścieków (Kawaharasaki i in.,[331]; Zilles i in., [332]; Miyauchi i in.,[333]). Metody oparte na fluorescencji i izolowaniu komórek zostały również zastosowane do identyfikacji bakterii redukujących azotyny w mieszanych społecznościach drobnoustrojów ściekowych (Safford i in., [309]; Mota i in.,[334]). Przeprowadzono też badania – obejmujące analizę FCM – mające na celu scharakteryzowanie wpływu dezynfekcji na społeczności drobnoustrojów. Większość z tych badań analizowała, w jaki sposób dezynfekcja zmniejsza TCC i ICC w przypadku naturalnych konsorcjów drobnoustrojów i/lub czystych kultur wskaźnikowych niepatogennych bakterii, przy użyciu kombinacji SYTO/SYBR i barwienia PI [335,336,269,337,338,339,340,341].

7.3. Metody molekularne – PCR

Najważniejszą kwestią w radzeniu sobie z patogenami zawartymi w ściekach i mogącymi mieć istotny wpływ na jakość wód odbiornika jest szybkie, skuteczne i dokładne ich rozpoznanie. W związku z powyższym podejmowane są próby stopniowego zastąpienia dotychczasowych metod nowymi technikami [342]. Wśród najbardziej obiecujących należy wymienić m.in.: metody molekularne, w tym np. oznaczenie ilościowe PCR.

Za początek technik PCR przyjmuje się rok 1983, kiedy to K.B. Mullis, wraz ze współpracownikami z Cetus Corporation w Emeryville w Kalifornii, stworzył i opisał przebieg łańcuchowej reakcji polimerazy – PCR (ang. *Polimerase Chain Reaction*). Najważniejszą ideą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) jest selektywna amplifikacja (powielanie) wybranych fragmentów DNA w warunkach laboratoryjnych. Poprzez ten proces uzyskuje się dużą liczbę kopii interesującego fragmentu DNA, co jest niezbędne do dalszych badań. Kluczową rolę w PCR odgrywa matryca DNA, która może być izolowana z różnych materiałów biologicznych (obecność polisacharydów w materiałach roślinnych niekiedy stanowi problem, gdyż mogą one hamować enzymy używane w pracach z DNA). Innym istotnym czynnikiem determinującym przebieg reakcji PCR jest polimeraza *Taq*, która wbudowuje nukleotydy do nici matrycowej zgodnie z zasadą komplementarności. Startery, czyli krótkie fragmenty DNA, są niezbędne do rozpoczęcia reakcji PCR. Ich specyfika polega na komplementarności do badanej sekwencji

DNA. Trifosforany deoksyrybonukleozydów (dNTP) stanowią kolejny składnik reakcji, zapewniając substrat dla polimerazy. Przebieg reakcji PCR wymaga cyklicznego powtarzania trzech etapów: denaturacji, hybrydyzacji starterów oraz elongacji. Denaturacja powoduje rozdzielanie podwójnej helisy DNA na pojedyncze nici przy wysokiej temperaturze, następnie obniża się temperaturę, co umożliwia przyłączenie starterów do matrycy. W trzecim etapie, podczas elongacji, polimeraza syntetyzuje nowy łańcuch DNA przy udziale dNTP [343].

Metody molekularne to techniki znacznie szybsze i bardziej czułe niż tradycyjne metody, jednak niektóre z nich mogą być szczególnie podatne na zakłócenia wywołane przez różnego rodzaju związki hamujące (np. kwasy huminowe czy metale) znajdujące się w próbkach środowiskowych. Analizy PCR mogą nie być pomocne w sytuacji, gdy niezbędne jest rozróżnianie badanych organizmów z podziałem na żywe i martwe, np. w przypadku oceny skuteczności procesów dezynfekcji. Problematyczne w analizie wód środowiskowych, w tym ścieków, metodą PCR okazują się niekiedy także różnego rodzaju inhibitory zawarte w badanych próbkach. Substancje te mogą izolować się razem z kwasami nukleinowymi, hamując reakcję PCR [342]. Ponadto liczba zidentyfikowanych zagrożeń, np. wirusów, może być zbyt duża dla prawidłowego wykorzystania metody. Technika ta nie umożliwia jednoznacznego określenia, czy wykryty wirus jest zakaźny, czy nie, nawet jeśli wynik okaże się pozytywny. Należy również zauważyć, że reakcja PCR umożliwia jedynie wykrycie jednego rodzaju wirusa na raz, a w badanych próbkach środowiskowych istnieje ich o wiele więcej [344,345,346].

Techniki PCR były i są stosowane w ocenie mikrobiologicznej każdego etapu oczyszczania ścieków:

- pienienie osadu czynnego – analizy PCR wykorzystywane były również w oznaczaniu bakterii odpowiedzialnych za pienienie osadu [347,348,349];
- nitryfikacja – jedno z pierwszych zastosowań PCR-ów w procesach oczyszczania ścieków przedstawili Hall i in. [350], którzy opracowali zestaw starterów/sond do wykrywania *Nitrospira spp.*, kluczowej grupy drobnoustrojów biorących udział w utlenianiu azotynów w procesach osadu czynnego; z kolei zespół Ahn i in.[351] z wykorzystaniem technik PCR zbadał społeczność bakterii nitryfikacyjnych w bioreaktorze. Harms i in.[352] oraz Layton i in.[353] opracowali natomiast metody ilościowe qPCR ukierunkowane na oznaczenie różnych gatunków bakterii *Nitrosomonas*, w tym *Nitrosomonas oligothrofa* czy *N. nitrosa*; natomiast Huang i in.[354] monitorowali dynamikę

populacji *Nitrospira* i *Nitrobacter* w indywidualnych systemach przydomowych oczyszczalni ścieków;

- anammox – jedną z głównych przeszkód w badaniu bakterii anammox jest ich niezwykle powolne tempo wzrostu (czas podwojenia, 11 dni), co skutkuje bardzo niskim przyrostem biomasy i długością czasu oznaczania; jedno z pierwszych badań qPCR bakterii anammox w systemach oczyszczania ścieków przeprowadzili Tsushima i in.[355]; natomiast Ma i in.[356] zbadali wpływ zmian temperatury na aktywność i aktywność bakterii anammox;
- denitryfikacja – Liu i in.[357] ocenili dynamikę ilościową dwóch denitryfikujących rodzajów bakterii: *Thauera* i *Azoarcus* w reaktorze oczyszczającym ścieki;
- usuwanie fosforu – He i in.[358] opracowali testy qPCR do wykrywania *Candidatus Accumulibacter* w oparciu o sekwencje DNA uzyskane z kilku procesów usuwania fosforu;
- ścieki oczyszczone – Lee i in.[359] zaprojektowali trzynaście zestawów starterów/sond specyficznych dla różnych bakterii chorobotwórczych i wskaźnikowych do badania m.in. ścieków końcowych dezynfekowanych promieniami UV; z kolei Ibekwe i in.[360] opracowali zestawy starterów/sond do monitorowania dynamiki populacji *E. coli*; Agudelo i in.[361] ocenili zaś zanieczyszczenie bakteriami fekalnymi próbek wody pochodzącej z różnych źródeł, w tym studni, wód gruntowych i ścieków, stosując metodę qPCR ukierunkowaną na *Bacteriodes spp.* i *Enterococcus faecalis* [362].

II. Część doświadczalna

1. Przedmiot badań

1.1. Oczyszczalnia ścieków w Tarnobrzegu

Miejska Oczyszczalnia Ścieków w Tarnobrzegu, będąca częścią przedsiębiorstwa Tarnobrzegskie Wodociągi Sp. z o.o [363]. rozpoczęła swoją działalność w 1998 roku. Jest zlokalizowana około 500 metrów od trasy przelotowej Tarnobrzeg-Sandomierz przy ul. Podwale 4 w Tarnobrzegu. Teren, na którym została usytuowana, charakteryzuje się płaskim ukształtowaniem oraz sąsiedztwem potoku Piskorzeniec. Oczyszczalnia sąsiaduje też z wałem przeciwpowodziowym rzeki Wisły (rysunek 4) [364].



Rysunek 4. Usytuowanie Miejskiej Oczyszczalni Ścieków w Tarnobrzegu
[źródło: www.google.maps.pl]



Rysunek 5. Lokalizacja oczyszczalni w Tarnobrzegu ul. Podwale 4
[źródło: www.maps.google.pl]

Usytuowanie oczyszczalni jest zgodne z planem miejscowego zagospodarowania przestrzennego. Badania geologiczno-inżynierskie wykazały, że obszar, na którym została zlokalizowana, znajduje się w rejonie Zapadliska Przedkarpackiego, zbudowanego z ilów trzeciorzędowych. Poziom wód gruntowych jest uzależniony zarówno od poziomu wód w rzece Wiśle, jak i w potoku Piskorzeniec. Dzięki zastosowaniu nowoczesnych technologii i innowacyjnych rozwiązań technicznych udało się zminimalizować niepożądane skutki eksploatacji oczyszczalni, sprawiając, że jej działalność jest uciążliwa dla otoczenia (rysunek 5) [364]. Odbiornikiem ścieków oczyszczonych z mechaniczno-biologicznej oczyszczalni ścieków w Tarnobrzegu jest rzeka Wisła (Rysunek 6).



Rysunek 6.Odbiornik ścieków oczyszczonych – rzeka Wisła
[źródło: fot. I. Kielb-Sotkiewicz]

Oczyszczalnia przyjmuje przede wszystkim ścieki bytowo-gospodarcze z niewielką domieszką ścieków przemysłowych (ok. 5%), a także wody opadowe i infiltracyjne – stanowiące 13,8% ogółu (wody podziemne pochodzące bezpośrednio z opadów lub powierzchniowych zbiorników wodnych) [363]. Projektowana przepustowość oczyszczalni wynosi średniodobowo $Q = 12\ 000\ \text{m}^3/\text{d}$, tj. $1,4\ \text{m}^3/\text{s}$, co stanowi około 1,6-krotność przepływu średniego niskiego (SNQ) wynoszącego $84\ \text{m}^3/\text{s}$ w rzece. Ilość ścieków dostających się do oczyszczalni w okresie bezdeszczowym wynosi $Q_{\text{sr.d.}} = 5\ 900\ \text{m}^3/\text{d}$, natomiast $Q_{\text{max.d.}} = 7\ 100\ \text{m}^3/\text{d}$. Dla okresu deszczowego parametry te wynoszą kolejno $Q_{\text{sr.d.}} = 8\ 900\ \text{m}^3/\text{d}$ oraz $Q_{\text{max.d.}} = 12\ 000\ \text{m}^3/\text{d}$. Pod względem hydraulicznym średnie obciążenie oczyszczalni wynosi mniej niż 50% jej projektowych możliwości, natomiast obciążenie ładunkiem zanieczyszczeń stanowi około 60% [364].

Komunalna oczyszczalnia ścieków w Tarnobrzegu jest jednostką mechaniczno-biologiczną składającą się z trzech głównych części: ciągu mechanicznego, części biologicznej opartej na metodzie osadu czynnego oraz linii przeróbki osadu ściekowego.

1.2. Oczyszczalnia ścieków w Rzeszowie

Oczyszczalnia Ścieków Miejskiego Przedsiębiorstwa Wodociągów i Kanalizacji w Rzeszowie, usytuowana przy ul. Ciepłowniczej 2, została uruchomiona w 1988 roku. Jej lokalizacja na prawym brzegu Wisłoka, około 3,1 km od centrum miasta, określa ją jako

kluczowy element infrastruktury miasta. Teren, na którym została zbudowana, osiąga wysokość od 197,70 do 200,20 m n.p.m. Rzeka Wisłok, lewy dopływ Sanu, przepływa w bliskiej odległości, około 100 m od oczyszczalni, skąd odbiera ścieki już po procesie oczyszczania. Budowa Rzeszowskiej Oczyszczalni Ścieków trwała w latach 1974–1988, a jej ciąg technologiczny był stopniowo unowocześniany od 1992 do 1998 roku. Po modernizacji zdolność przetwarzania ścieków wzrosła do 62 500 m³/dobę. Obciążenia hydrauliczne dla oczyszczalni wynoszą $Q_{d\dot{s}r} = 62\,500\text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$, $Q_{d\text{max}} = 75\,000\text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$, obsługują one 400 000 równoważników mieszkańców. W kolejnych latach przeprowadzono szereg modernizacji – w 2001 roku system oczyszczania ścieków zastąpiono systemem MUCT, wprowadzając jednocześnie recyrkulację z komory denitryfikacji do komory defosfatacji. W latach 2003–2004 rozbudowano sekcję osadową, dodając dwie komory fermentacyjne o pojemności roboczej 2200 m³ każda. Kolejna modernizacja miała miejsce w latach 2012–2013 i dotyczyła części mechanicznej oczyszczalni, obejmującej piaskowniki, kratownice, zbiorniki oraz osadniki wstępne i wtórne [365].

Proces oczyszczania I^o w oczyszczalni ścieków rozpoczyna się od oczyszczania mechanicznego. Ścieki napływające z pompowni są kierowane do punktu zlewnego, a następnie kanałem surowych ścieków trafiają do budynku krat. Tam, w trzech kolejnych urządzeniach (kratach, piaskownikach napowietrzanych i osadnikach wstępnych), zachodzą procesy cedzenia i sedymentacji. Dodatkowym obiektem I^o oczyszczania jest zbiornik retencyjny ścieków opadowych. II^o oczyszczanie – biologiczne – realizowane jest za pomocą osadu czynnego pracującego w systemie MUCT i odbywa się w komorach biologicznych: 1 komora defosfatacji (komora anaerobowa), 2 komory denitryfikacji (komory anoksydacyjne), 2 komory nitryfikacji I^o i 2 komory nitryfikacji II^o (komory aerobowe).

Następnie ścieki kierowane są do czterech osadników wtórnych. Osad zbierany na dnie osadników jest odprowadzany za pomocą systemu ssawkowo-pompowego z systemem zgarniania i odprowadzania części pływających do studni rozdzielczej osadów. Stamtąd trafia do pompowni osadu recykulowanego i nadmiernego. Dodatkowo stosuje się chemiczne końcowe strącanie fosforu ze ścieków za pomocą siarczanu żelaza. Oczyszczone mechanicznie ścieki są odprowadzane kolektorem do rzeki Wisłok w km 58 + 300 [366,367,365,368]. Oczyszczalnia została zaprojektowana na przepływ $Q_{\dot{s}r} = 62\,500\text{ m}^3/\text{d}$ i 400 tys. RLM. Obecnie średni dobowy przepływ wynosi ok. 45 000 m³/d.



Rysunek 7.Widok na oczyszczalnię ścieków w Rzeszowie
źródło: [368]

2. Metodyka badań

2.1. Materiał i jego przygotowanie

Ścieki oczyszczone pobierano z dwóch oczyszczalni ścieków – komunalnych oczyszczalni ścieków w Rzeszowie i Tarnobrzegu, różniących się od siebie wielkością i wydajnością pracy. Na obu zastosowano tę samą technologię oczyszczania ścieków – technologię osadu czynnego. Oczyszczone ścieki zastosowane w badaniach pobierano w latach 2021–2024, w różnych miesiącach w skali roku, od lutego do października.

Próby pobierane były zgodnie z normą PN-ISO 5667-10:2021-11 Jakość wody. Pobieranie próbek. Część 10: Wytyczne dotyczące pobierania próbek ścieków. Postanowienia, które zawiera norma 5667-10:2021, stosuje się do wszystkich rodzajów ścieków, w tym również do ścieków bytowo-gospodarczych oczyszczonych. Ścieki do analiz pobierane były jako próbka jednorazowa, czyli taka, której cała objętość jest pobierana w tym samym czasie i/lub miejscu, co w praktyce oznacza, że jest pobrana losowo. Zgodnie z wymogami normy 5667-10:2021 próbki jednorazowe pobierane były do mających szeroką szyjkę butelek o pojemności 2 dm³ lub mniejszych, zależnie od oznaczeń. Próbkę ścieków pobierano w sposób manualny (ręcznie) metodą pośrednią – z użyciem specjalnego czerpaka w postaci naczynia zamocowanego na drążku teleskopowym (wykonanego z obojętnego chemicznie materiału, dzięki czemu nie wpływało na wyniki wykonywanych analiz), bezpośrednio z koryta odpływowego odprowadzającego oczyszczone ścieki do odbiornika. Pobór próbek ścieków do badań mikrobiologicznych wykonano poprzez umieszczenie odpowiedniego naczynia w uchwycie czerpaka, zdjęcie korka zabezpieczającego naczynie tak, aby nie zanieczyścić korka, a następnie zanurzenie naczynia pod powierzchnię ścieków szyjką w dół, skośnie do kierunku prądu. Po zanurzeniu na właściwą głębokość naczynie odwracano szyjką w kierunku przeciwnym do prądu i napełniano. Po wyjęciu naczynia z próbką odlewano około 1/4 próbki i od razu zabezpieczano naczynie korkiem. Po pobraniu ścieki były natychmiast transportowane do laboratorium [369].

2.2.Przebieg eksperymentu

2.2.1. Metodyka badania wpływu biopreparatów na jakość mikrobiologiczną ścieków oczyszczonych

Do oceny możliwości wykorzystania biopreparatów w celu poprawy jakości mikrobiologicznej ścieków oczyszczonych wykorzystano 12 różnych biopreparatów (tabela 7).

Tabela 7. Charakterystyka biopreparatów wykorzystanych w pracy

Lp.	Nazwa handlowa biopreparatu	Skład	Rodzaj podłoża	Bibliografia
1.	Bio-Trakt Plus	- bakterie kwasu mlekowego – $7,6 \times 10^7$ - promieniowce - drożdże $4,4 \cdot 10^4$	wyciągi ziołowe	370
2.	SCD2	- bakterie kwasu mlekowego $7,2 \times 10^7$ - drożdże $8,0 \cdot 10^3$	wyciągi ziołowe	badania własne
3.	ACS AQUA 8T	- bakterie kwasu mlekowego: <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> $5,0 \times 10^6$ jtk/cm ³ - drożdże $5,0 \times 10^3$ jtk/cm ³)	melasa z trzciny cukrowej	371,372,373
4.	Em Farma	- bakterie kwasu mlekowego $7,8 \times 10^7$ - drożdże - bakterie fototropowe - promieniowce - grzyby fermentujące	melasa z trzciny cukrowej	374
5.	QUANTUM	- <i>Rhodopseudomonas palustris</i> ($7,5 \times 10^5$ jtk/ cm ³) - <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ($7,5 \times 10^5$ jtk/ cm ³) - <i>Bacillus licheniformis</i> ($7,5 \times 10^5$ jtk/ cm ³)	humus torfowy/ kwas humusowy	375,376
6.	ACS ODO_1	- bakterie kwasu mlekowego $8,1 \times 10^7$ - bakterie fotoautotroficzne - drożdże - fermentowane otręby pszenne - minerały	melasa z trzciny cukrowej	371,373,372
7.	FreeFlow	- <i>Bacillus subtilis</i> - <i>Bacillus thuringiensis</i> - <i>Bacillus licheniformis</i> - <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> - <i>Bacillus simplex</i> - <i>Pseudomonas fluorescens</i> - <i>Pseudomonas putida</i> Ilość 3×10^{13} jtk/ cm ³	bakterie w formie liofilizatu	377
8.	Em Probiotyk	bakterie kwasu mlekowego: <i>L. casei</i> - <i>L. parafarraginis</i> , <i>L. farraginis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. plantarum</i> , $1,5 \times 10^6$ jtk/ cm ³	na bazie zakiszonej melasy z trzciny cukrowej	378

		- <i>Bacillus subtilis</i> - <i>Sacharomyces cerevisiae</i>		
9.	Em White Refresh	- bakterie kwasu mlekowego - bakterie fotosyntetyzujące - drożdże - promieniowce	koncentrat owocowy, ekstrakt z otrąb ryżowych, ekstrakt ziołowy z lawendy i mięty	379
10.	A6	- bakterie kwasu mlekowego $3,6 \times 10^7$ jtk/ cm ³ - drożdże $6,0 \times 10^3$ jtk/ cm ³	melasa trzcinowa	badania własne
11.	A7	- bakterie kwasu mlekowego $6,8 \times 10^7$ jtk/ cm ³ - drożdże $2,0 \times 10^4$ jtk/ cm ³	melasa trzcinowa	badania własne
12.	EM Bio firmy Greenland	- bakterie kwasu mlekowego - bakterie fotosyntetyzujące - bakterie saprofityczne - drożdże - grzyby - promieniowce. Koncentracja mikroorganizmów powyżej 5×10^7 jtk/ cm ³	melasa trzcinowa	380,381

Ścieki oczyszczone o objętości 1 dm³ przelewano do sterylnych butelek, dodawano biopreparat i dokładnie mieszano. Butelki zakryto bawełnianą gazą jałową tak, aby zapewnić dostęp tlenu i pozwolić mikroorganizmom zawartym w biopreparatach na rozwój przy jednoczesnym ograniczeniu przedostawania się zanieczyszczeń z zewnątrz. Tak przygotowane próby przechowywano w temperaturze 20°C i z dostępem światła (zarówno temperatura, jak i dostęp światła w najwyższym stopniu odzwierciedlały warunki rzeczywiste). Próby wytrząsano trzykrotnie w ciągu doby. Dodatkowo mieszano je za pomocą bagietki przed każdym wykonaniem oznaczeń. Badania przeprowadzano w różnych konfiguracjach, aby uwzględnić wpływ różnych czynników (tabela 8).

Tabela 8. Konfiguracje w jakich przeprowadzono poszczególne serie badawcze, w zależności od czynnika determinującego

Seria	Czynnik determinujący	Wykorzystany biopreparat	Charakterystyka
1.	Dawka biopreparatu	Biopreparaty: - Bio-Trakt Plus - ACS ODO_1	Zastosowano różne dawki biopreparatu: 1 cm ³ , 5 cm ³ i 10 cm ³ biopreparatu/dm ³ ścieków oczyszczonych. Analizy wykonano w dniu pobrania ścieków oraz 24h od dawkowania biopreparatów.
2.	Czas działania biopreparatu	Biopreparaty: - SCD2 - ACS AQUA 8T - Em FARMA - QUANTUM	Zastosowano dawkę biopreparatu: 5 cm ³ biopreparatu/dm ³ ścieków oczyszczonych. Analizy wykonano po 24, 48, 72 godzinach oraz po 7 dniach.

3.	Dodatkowe natlenianie	Biopreparat ACS ODO_1	Badania przeprowadzono w dwóch wariantach: z dodatkowym natlenianiem oraz z ograniczonym dostępem tlenu. W tym celu wykorzystano generator tlenu firmy Hailea (o parametrach: 220-240V; 50Hz; 2,5W; 0,2L/min; $\geq 0,018$ MPa).
			Zastosowano dawkę biopreparatu: 5 cm ³ biopreparatu/dm ³ ścieków oczyszczonych.
			Analizy wykonano w dniu pobrania ścieków oraz 24h od nastawienia prób badawczych.
4.	Forma biopreparatu (płynna/zliofilizowana)	Biopreparat FreeFlow	Próby przygotowano w dwóch konfiguracjach: I: Biopreparat podany w formie zliofilizowanej: 1 tabletki biopreparatu/dm ³ ścieków oczyszczonych – dawka 100 mg/dm ³ II: Biopreparat namnożony na bulionie (1 tabletki biopreparatu zaaplikowana do próbki z przygotowanym bulionem odżywczym, a następnie inkubowana w temperaturze 28°C przez 24h), w dawce 5 cm ³ biopreparatu/dm ³ ścieków oczyszczonych.
			Analizy wykonano w dniu pobrania ścieków oraz 24h od nastawienia prób.
5.	Rodzaj podłoża	Biopreparaty: - EM Probiotyk - EM White Refresh - Bio-Trakt Plus - QUANTUM - A6	Przebadane biopreparaty różniły się między sobą podłożem, na którym namnażane były mikroorganizmy: <ul style="list-style-type: none"> • melasa z trzciny cukrowej – EM Probiotyk, A6 • koncentrat owocowy – EM White Refresh • wyciągi ziołowe – Bio-Trakt Plus • humus torfowy – QUANTUM
			Zastosowano dawkę biopreparatu: 5 cm ³ biopreparatu/dm ³ ścieków oczyszczonych.
			Analizy wykonano w dniu pobrania ścieków oraz 24h od zadawkowania biopreparatów w ściekach.
6.	Bakterie z biopreparatu oddzielone od podłoża	Biopreparaty: - A7 - Em Bio	Izolację samych bakterii przeprowadzono wg następującej procedury: 5 cm ³ biopreparatu w formie płynnej filtrowano przez filtr membranowy o średnicy porów 0,2µm, a następnie sącdek z bakteriami umieszczano w kolbie ze ściekami oczyszczonymi – liczba pozostałych na filtrze mikroorganizmów odpowiadała dawce 5 cm ³ biopreparatu na dm ³ ścieków oczyszczonych.
			Próby inkubowano w trzech wariantach temperaturowych: 4°C, 15°C i 28°C.
			Analizy wykonano w dniu pobrania ścieków oraz po 24, 48, 72 godzinach i 7 dniach.

*Próby inkubowano w temperaturze pokojowej 20°C z wyjątkiem wariantu 6. – Bakterie z biopreparatu oddzielone od podłoża

W tak przygotowanych próbach badawczych każdorazowo przebadano wpływ czynnika determinującego (zgodnie z tabelą 8) na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* ze ścieków oczyszczonych. Obserwowano także zmiany wartości RLU oraz liczebność poszczególnych populacji w ramach analizy FCM. Przebadano również wpływ biopreparatów wykorzystanych w pracy na pH, zawiesinę ogólną, mętność oraz barwę analizowanych prób. Ponadto dla biopreparatów: EM Probiotyk, EM White Refresh i ACS ODO_1 oraz Bio-Trakt Plus wykonano oznaczenia liczebności paciorkowców kałowych.

Analizy molekularne PCR wykonano dla ścieków z dodatkiem biopreparatów: ACS ODO_1, SCD, Em Probiotyk, ACS AQUA 8T oraz A6. Próby ścieków oczyszczonych o objętości 1 dm³ zaszczepiono ww. biopreparatami w dawce 5 cm³/dm³. Próby były wytrząsane przez okres 5 dni w temp. 20°C. Badanie, w formie zlecenia, wykonane zostało przez Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach.

2.2.2. Metodyka badania działania promieniowania ultrafioletowego UV w dezynfekcji ścieków oczyszczonych

Do procesu dezynfekcji zastosowano lampę przepływową UV-C BALLAST model EB-F6, o mocy promieniowania 4-6W, 200-240V, 50/60Hz, 0,05A, w zestawie z systemem dozowania AQUA-TREND. Jest to lampa z niskociśnieniowym promiennikiem, emitująca promieniowanie o ustalonej określonej długości fali (promieniowanie monochromatyczne), które wynosi 254 nm. Zastosowano różne czasy ekspozycji, co wiąże się z różnym przepływem ścieków przez promiennik UV. Dezynfekowano ścieki o objętości 1 dm³.

Przyjmując objętość 1 dm³ (0,001 m³), obliczono natężenie promieniowania (I) jako moc (P) podzieloną przez objętość (V):

wzór 1:

$$I = \frac{P}{V}$$

gdzie:

I – natężenie promieniowania (W/m³)

P – moc (W)

V – objętość (m³)

Dawka promieniowania UV została zdefiniowana jako iloczyn natężenia promieniowania (I) i czasu ekspozycji (t), co można wyrazić jako:

wzór 2:

$$UVD = I \cdot tR$$

gdzie:

UVD – dawka promieniowania (dostarczona energia na jednostkę powierzchni (J/m²))

I – natężenie promieniowania (moc dostarczoną przez źródło UV) (W/m²)

tR – czas ekspozycji (s) [382,383]

Jeśli zatem natężenie promieniowania jest stałe, czas ekspozycji będzie odwrotnie proporcjonalny do dawki promieniowania. Zgodnie z ww. definicją wyliczono dawki promieniowania zastosowane w badaniach, zakładając, że moc lampy podana przez producenta wynosi 4-6W:

1) Czas ekspozycji: 30,7 s, zwany dalej UV100

$$\text{Dla mocy 4W: } UVD = (4W : 0,001m^3) \cdot 30,7s = 122\,800 \text{ J/m}^3$$

$$122\,800 \text{ J/m}^3 \times 1cm = 1\,228 \text{ J/m}^2$$

$$1\,228 \text{ J/m}^2 = 1\,228 \times 1\,000 \text{ mJ/m}^2 = 1\,228\,000 \text{ mJ/m}^2$$

$$1\,228\,000 \text{ mJ/m}^2 = 1\,228\,000 \text{ mJ} \times \frac{1}{1m^2} = 1\,228\,000 \text{ mJ} \times \frac{1}{10\,000 \text{ cm}^2} = 122,8 \text{ mJ/cm}^2$$

$$\text{Dla mocy 6W: } UVD = (6W : 0,001m^3) \cdot 30,7s = 184\,200 \text{ J/m}^3 = 184,2 \text{ mJ/cm}^2$$

$$\text{Średnia: } 153\,500 \text{ J/m}^3 = \underline{153,5 \text{ mJ/cm}^2}$$

2) Czas ekspozycji: 39,3 s, zwany dalej UV80

$$\text{Dla mocy 4W: } UVD = (4W : 0,001m^3) \cdot 39,3 \text{ s} = 157\,200 \text{ J/m}^3 = 157,2 \text{ mJ/cm}^2$$

$$\text{Dla mocy 6W: } UVD = (6W : 0,001m^3) \cdot 39,3 \text{ s} = 235\,800 \text{ J/m}^3 = 235,8 \text{ mJ/cm}^2$$

$$\text{Średnia: } 196\,500 \text{ J/m}^3 = \underline{196,5 \text{ mJ/cm}^2}$$

3) Czas ekspozycji: 52,3 s, zwany dalej UV60

$$\text{Dla mocy 4W: } UVD = (4W : 0,001m^3) \cdot 52,3 \text{ s} = 209\,200 \text{ J/m}^3 = 209,2 \text{ mJ/cm}^2$$

$$\text{Dla mocy 6W: } UVD = (6W : 0,001m^3) \cdot 52,3 \text{ s} = 313\,800 \text{ J/m}^3 = 313,8 \text{ mJ/cm}^2$$

$$\text{Średnia: } 261\,500 \text{ J/m}^3 = \underline{261,5 \text{ mJ/cm}^2}$$

4) Czas ekspozycji: 1 min 18s (78 s) zwany dalej UV40

Dla mocy 4W: $UVD = (4W : 0,001m^3) \cdot 78 s = 312\ 000 J/m^3 = 312,0 mJ/cm^2$

Dla mocy 6W: $UVD = (6W : 0,001m^3) \cdot 78 s = 468\ 000 J/m^3 = 468,0 mJ/cm^2$

Średnia: $390\ 000 J/m^3 = \underline{390,0 mJ/cm^2}$

Po przeprowadzeniu procesu dezynfekcji zbadano, jak długo utrzymuje się uzyskany efekt dezynfekcji (w pracy określanej jako stabilność mikrobiologiczna ścieków oczyszczonych po procesie dezynfekcji). Zdezynfekowane ścieki o objętości 150 cm³ w sterylnych 250 cm³ kolbach zatykano sterylną gazą i umieszczano w następujących warunkach:

1. w lodówce w temperaturze 4°C bez dostępu światła,
2. w inkubatorze w temperaturze 20°C bez światła,
3. w inkubatorze w temperaturze 20°C z dodatkowym naświetlaniem.

W próbach wykonywano następujące analizy mikrobiologiczne:

- liczebność bakterii psychrofilnych,
- liczebność bakterii mezofilnych,
- liczebność bakterii z grupy *coli*.

Analizy wykonywano w dniu dezynfekcji ścieków oraz po 24, 48, 72 godzinach i 7 dniach.

2.2.3. Metodyka badania skuteczności działania ozonu w dezynfekcji ścieków oczyszczonych

Proces dezynfekcji badanych ścieków ozonem przeprowadzono w szklanej, sterylnej butelce o pojemności 1dm³. Ozonowanie ścieków wykonano poprzez rozpuszczenie ozonu gazowego wytwarzanego przez ozonator ZY-H170 o wydajności generatora 7 g/h (117 mg/min), a następnie wprowadzenie do niego ścieków za pomocą układu kamieni (dyfuzorów). Dawkę ozonu zdefiniowano jako całkowitą ilość ozonu rozpuszczonego w ściekach, zgodnie z metodyką Hach ozon Method 8311.

Dawki ozonu w zależności od czasu ozonowania zbadano zgodnie z metodyką rekomendowaną przez firmę Hach. Najwyższą dawkę ozonu – 13 mg/dm³ – uzyskano dla czasu ozonowania ścieków wynoszącego 11 minut. Ozonowanie powyżej 11 minut nie przekładało się na dalszy wzrost ilości ozonu w próbie (tabela 9).

Tabela 9. Dawka ozonu w zależności od czasu ozonowania

czas ozonowania	stężenie ozonu [mg/dm³ O₃]
1 minuta	1
3 minuty	2
5 minut	6
7 minut	9
9 minut	11
11 minut	13
13 minut	12
15 minut	12

Po przeprowadzeniu procesu dezynfekcji zbadano trwałość uzyskanego efektu (stabilność). Do badań stabilności mikrobiologicznej wybrano ścieki po 9 oraz po 11 minutach ozonowania. Próbki ścieków (150 cm³) rozlano do sterylnych butelek o pojemności 250 cm³ i umieszczono w inkubatorach w następujących warunkach:

1. w lodówce w temperaturze 4°C,
2. w inkubatorze w temperaturze 15°C,
3. w inkubatorze w temperaturze 28°C.

Analizy wykonywano w dniu dezynfekcji ścieków oraz po 24, 48, 72 godzinach i 7 dniach.

2.2.4. Ocena stabilności mikrobiologicznej ścieków po przeprowadzonych procesach dezynfekcji

Ścieki oczyszczone po zastosowanych procesach dezynfekcji UV i ozonowania poddano procedurze oceny stabilności mikrobiologicznej. W tym celu próby o pojemności 150 cm³ w sterylnych 250 cm³ kolbach, zatykano sterylną gazą i umieszczano w inkubatorach o zadanych warunkach. Próby inkubowano w temperaturach zależnych od wariantu badawczego: w badaniach nad biopreparatami – w temperaturze 20°C z dostępem światła, w badaniach dot. promieniowania UV – w temperaturze 4 i 20°C z dodatkowym naświetlaniem i z ograniczonym dostępem światła, natomiast w badaniach nad ozonowaniem – w temperaturze 4, 15 i 28°C. Liczba butelek odpowiadała liczbie oznaczeń na każdą dobę eksperymentu, tak aby nie dopuścić do zanieczyszczenia próby. Stabilność mikrobiologiczną zdezynfekowanych ścieków oceniono wprost – na podstawie obserwacji wzrostu liczebności bakterii psychrofilnych, mezofilnych, bakterii z grupy *coli* i form przetrwalnikowych. Obserwacje prowadzone były w czasie do 7 dni. Próbki do analizy pobierano po upływie 24, 48, 72 godzin i 7 dni [384,385,386]. Stabilność mikrobiologiczną prób stwierdzano wówczas, gdy liczba

oznaczanych mikroorganizmów po czasie inkubacji była równa poziomowi wyjściowemu lub mniejsza od niego lub równa liczbie oznaczonej przed inkubacją:

wzór 3:

$$S = N_k/N_p < 1$$

gdzie:

S – stabilność mikrobiologiczna

N_k – liczba mikroorganizmów po inkubacji

N_p – liczba mikroorganizmów przed inkubacją [387].

2.2.5. Ocena wpływu biopreparatów na jakość mikrobiologiczną ścieków po procesach dezynfekcji

Zdezynfekowane ścieki po wzbogaceniu biopreparatami poddawano procedurze oceny jakości mikrobiologicznej. Oceny dokonano w oparciu o zmiany liczebności bakterii z grupy *coli* w próbach. Procedurę przeprowadzono w dwóch wariantach:

Wariant I – metody łączone: promieniowanie UV i biopreparaty FreeFlow i EmBio

Badania skuteczności działania metod łączonych dezynfekcji ścieków promieniowaniem UV, a następnie ich wzbogacenie biopreparatami, przeprowadzono w następującej kolejności:

Etap I – ocena wpływu biopreparatów na ścieki oczyszczone zdezynfekowane promieniami UVC. Do procesu dezynfekcji zastosowano lampę UVC BALLAST model EB-F6 (jw.) Zastosowano dawkę ekspozycji wynoszącą 70 mWcm⁻² i czas naświetlania 31s. Po dezynfekcji przeprowadzonej promiennikiem UVC do ścieków dodawano biopreparaty w następującej konfiguracji:

I. Biopreparat FreeFlow firmy NCH:

1. w formie płynnej w dawce 5 cm³/dm³ – bakterie namnożone na bulionie odżywczym,
2. w formie zliofilizowanej w dawce 100 mg/dm³,
3. bakterie z biopreparatu oddzielone metodą filtracji membranowej od bulionu odżywczego, na którym zostały namnożone.

II. Biopreparat EM Bio firmy Greenland:

1. w formie płynnej – mikroorganizmy namnożone na melasie, w dawce $5 \text{ cm}^3/\text{dm}^3$,
2. mikroorganizmy oddzielone od podłoża, analogicznie jak przy biopreparacie FreeFlow.

Oznaczenia liczebności bakterii *coli* i *E. coli* oraz stężenie ATP przeprowadzono po 24 godzinach.

Etap II – ocena długości trwania efektu higienizacyjnego uzyskanego przez połączenie promieniowania UVC i mikroorganizmów z biopreparatu Em Bio. Ocena wpływu biopreparatu, dla którego uzyskano korzystny wynik higienizacji – brak rozwoju bakterii *coli*. Po wzbogaceniu biopreparatem Em Bio (bakteriami wyizolowanymi od podłoża) zdezynfekowanych promieniami UVC ścieków, próby umieszczono w następujących warunkach:

1. w lodówce w temperaturze 4°C bez dostępu światła,
2. w inkubatorze w temperaturze 20°C bez dostępu światła,
3. w inkubatorze w temperaturze 20°C z dostępem światła.

W inkubatorze jako źródło światła zastosowano świetlówkę rtęciową Philips. Ocenę wpływu biopreparatów prowadzono po 24, 48, 72 godzinach i po 7 dniach od zadawkowania biopreparatu.

Wariant II – metody łączone: ozonowanie i biopreparat A7

Badania skuteczności działania metod łączonych dezynfekcji ścieków ozonem, a następnie ich wzbogacenie biopreparatem A7 przeprowadzono w następującej kolejności:

Etap I – ocena wpływu biopreparatu na ścieki oczyszczone zdezynfekowane ozonem. W badaniach zastosowano dawki ekspozycyjne wynoszące kolejno 9 minut (dla serii 1) oraz 11 minut (dla serii 2). Badania przeprowadzono w różnych konfiguracjach:

1. w formie płynnej – mikroorganizmy namnożone na melasie w dawce $5 \text{ cm}^3/\text{dm}^3$,
2. bakterie z biopreparatu oddzielone od bulionu odżywczego, na którym zostały namnożone, metodą filtracji membranowej.

Etap II – ocena długości trwania efektu higienizacyjnego uzyskanego przez połączenie ozonowania i mikroorganizmów z biopreparatu A7. Po wzbogaceniu biopreparatem próby umieszczano w następujących temperaturach:

1. w lodówce w temperaturze 4°C,
2. w cieplarni w temperaturze 15°C,
3. w cieplarni w temperaturze 28°C.

Analizy prowadzono w dniu dezynfekcji oraz po 24, 48, 72 godzinach i po 7 dniach.

2.3. Metodyka oznaczeń

2.3.1. Wskaźniki fizykochemiczne

Parametry ścieków oczyszczonych, pobieranych do badań z rzeszowskiej i tarnobrzeskiej oczyszczalni ścieków, spełniały wszystkie obowiązujące prawnie normy jakości (tabela 10), a oznaczenia jakości zostały wykonane przez akredytowane laboratorium wody i ścieków miejskich oczyszczalni ścieków w Tarnobrzegu i w Rzeszowie.

Tabela 10. Metody badawcze wykorzystywane do analiz ścieków oczyszczonych wykonywane przez akredytowane laboratorium w Tarnobrzegu

azot Kjeldahla [mg/l]	PN-EN 25663:2001 metoda miareczkowa
azot azotanowy [mg/l]	PN-82/C-04576 08 metoda spektrofotometryczna
azot azotynowy [mg/l]	PN-EN 26777:1999 metoda spektrofotometryczna
azot ogólny [mg/l]	PN-73/C-04576/14 (z obliczeń)
azot amonowy [mg/l]	PN-ISO 7150-1-2002 metoda spektrofotometryczna
fosfor ogólny [mg/l]	PN-EN ISO 6878:2006 p.7 +Ap1 +Ap2: 2010
ChZT [mg/l]	PN-ISO 15705:2005 metoda spektrofotometryczna
BZT5 [mg/l]	PN-EN ISO 5815-1:2019-12 metoda elektrochemiczna

Skuteczność przeprowadzonych procesów dezynfekcji i higienizacji ścieków została oceniona na podstawie wybranych fizykochemicznych i mikrobiologicznych wskaźników jakości ścieków. Analizy fizykochemiczne wykonano zgodnie z metodyką dedykowaną do analiz wody i ścieków (tabela 11).

Tabela 11. Metody badawcze wykorzystywane do analiz

pH	PN-90/C-04540/01. Woda i ścieki. Oznaczanie pH metodą elektrometryczną
Mętność	PN-EN ISO 7027 – oznaczanie mętności
Barwa – metoda spektrofotometryczna	PN-EN ISO 7887 – jakość wody – badanie i oznaczanie barwy
Zawiesiny ogólne	PN-EN 872:2007 +Ap1:2007 metoda wagowa

Oznaczenie stężenia ozonu w kolejnych, dezynfekowanych próbach wykonano zgodnie z metodą Indygo 0,01 (metoda 8311; DOC316.53.01106). W tym celu wykorzystano spektrofotometr DR500 firmy Hach-Lange. Zgodnie z metodyką niebieski kolor indygo uległ wybieleniu proporcjonalnie do ilości ozonu zawartego w próbce (odczynnik indygo reaguje natychmiastowo i ilościowo z ozonem). Pomiar długość fali dla spektrofotometru wynosił 600 nm. Aby zapobiec ulatnianiu się ozonu, próbki poddano analizie natychmiast po dezynfekcji ozonem, nie wstrząsano próbkami i nie dopuszczono do zmiany temperatury w badanej próbce. Jako wodę wolną od ozonu wykorzystano wodę dejonizowaną.

2.3.2. Wskaźniki mikrobiologiczne

Posiewy mikrobiologiczne wykonywano w komorze laminarnej. Liczbę bakterii oznaczono za pomocą klasycznych metod hodowlanych, zgodnie z obowiązującymi normami (tabela 12).

Tabela 12. Wskaźniki jakości mikrobiologicznej badanych ścieków i biopreparatów

1.	Liczba bakterii <i>coli</i>	Metoda hodowli według normy PN-EN ISO 9308-2:2014-06 Metoda NPL (fermentacyjno-probówkowa) według normy PN-ISO 4831:2007
2.	Liczba bakterii <i>Escherichia coli</i>	Metoda hodowli według normy PN-EN ISO 9308-2:2014-06
3.	Ogólna liczba bakterii w 37°C po 24h – liczba bakterii mezofilnych	Metoda posiewów wgłębnych na standardowym agarze odżywczym według normy PN-EN ISO 6222:2004
4.	Ogólna liczba bakterii w 22°C po 72h - liczba bakterii psychrofilnych	
5.	Paciorkowce kałowe	Metoda hodowli według normy PN-C-04615-25:1982 na agarze Slanetz i Bartley
6.	Ogólna liczba bakterii kwasu mlekowego	Metoda hodowli według normy ISO 15214: 1998 na agarze MRS
7.	Ogólna liczba drożdży	Metoda hodowli według normy ISO 21527-1:2008 na agarze PDA
8.	Luminometryczne oznaczenie stężenia ATP*	Protokół PROMEGA dla luminometru 20/20
9.	FCM	Sysmex – Partec protocol for CytFlow Cube 6
10.	PCR	

* Wyniki podano jako wartość RLU odczytanej z luminometru,

Oznaczenia bakterii z grupy *coli* wykonano trzema metodami:

- 1) metodą płytkową Kocha z wykorzystaniem posiewu wgłębnego,
- 2) metodą filtrów membranowych,
- 3) metodą fermentacyjno-probówkowa (NPL).

Oznaczenia bakterii psychrofilnych, mezofilnych oraz form przetrwalnikowych wykonano metodą płytkową Kocha z wykorzystaniem posiewu wgłębnego. Tradycyjne metody hodowlane zastosowano również do hodowli bakterii kwasu mlekowego oraz drożdży.

Ad.1. Metoda płytkowa Kocha z wykorzystaniem posiewu wgłębnego – ze względu na duże zanieczyszczenie ścieków oczyszczonych, wykonano rozcieńczenia zgodnie z metodą seryjnych rozcieńczeń z użyciem płynu Ringera [388]; w badaniach zastosowano 1 cm³ próby oraz różne podłoża mikrobiologiczne: agar odżywczy A [g/dm³] dla bakterii mezo- i psychrofilnych oraz form przetrwalnikowych, pożywkę chromogenną Chromocult [mg/dm³] dla bakterii *coli* i *E. coli*. oraz pożywkę Slanetz i Bartley do hodowli paciorkowców kałowych. Wykorzystano także podłoża MRS i PDA do hodowli specyficznych mikroorganizmów: podłoże MRS do hodowli bakterii kwasu mlekowego oraz podłoże PDA do hodowli drożdży i grzybów. Próby ścieków umieszczano na płytkach i zalewano odpowiednim podłożem. Po zastygnięciu podłoża płytki odwrócono do góry dnem, wstawiono do cieplarek i inkubowano:

- 48 h w temp. 37°C - bakterie z grupy *coli*,
- 48 h w temp. 37°C – paciorkowce kałowe,
- 48 h w temp. 37°C – bakterie mezofilne,
- 72 h w temp. 22°C – bakterie psychrofilne,
- 72 h w temp. 28°C – bakterie przetrwalnikujące,
- 24 h w temp. 37°C – bakterie kwasu mlekowego [389,390],
- od 3 do 7 dni w temp. 25–30°C – drożdże i bakterie.

Po okresie inkubacji zliczono wyhodowane kolonie. Wykorzystano w tym celu m.in. automatyczny licznik kolonii aCOLyte firmy SYNBIOSIS. Uzyskane dane dokumentowano [391]. Ostateczny wynik podano jako jednostki tworzące kolonie jtk/1cm³ dla bakterii psychrofilnych, mezofilnych, przetrwalników i bakterii kwasu mlekowego oraz jako jtk/100cm³ dla bakterii *coli* i *Escherichia coli*.

Ad.2. Metoda filtrów membranowych – filtrację badanych ścieków oczyszczonych wykonano na zestawie filtracyjnym Merck, z użyciem sączków membranowych celulozowych

Merck Milipore o średnicy całkowitej 0,45 mm i średnicy porów 0,2 μm . Sączono 100 cm^3 próbki, a sączek przenoszono na podłoże stałe (pożywkę agarową ENDO [mg/dm^3] oraz pożywkę chromogenną Chromocult [mg/dm^3]). Inkubację przeprowadzono w temperaturze i czasie właściwym dla danego rodzaju bakterii. Po okresie inkubacji przeliczono kolonie wyrosłe na powierzchni sączka [392]. Wynik podawano w jtk/ 100cm^3 .

Ad.3. Metoda fermentacyjno-probówkowa – ilościowe oznaczenie drobnoustrojów z grupy *coli* przeprowadzono w oparciu o obliczenie najbardziej prawdopodobnej liczby (NPL), zestawem trzyprobówkowym, posługując się tablicami Mc Cready'ego. Wykonano analizy w trzech powtórzeniach i rozcieńczeniach dziesiętnych ścieków od 10^{-1} do 10^{-8} , wykorzystując podłoże płynne z laktozą i purpurą bromokrezolową – Mac Conkey Bulion. Następnie próby poddano inkubacji w temperaturze 37°C przez 24÷48h. Ocena poszczególnych prób polegała na stwierdzeniu, w przypadku pożywki płynnej, zmiany barwy bulionu z fioletowej na żółtą – rozkładu laktozy oraz obecności gazu w rurce Durhama. Jeżeli zaobserwowano wyżej wymienione cechy, próbę oceniano pozytywnie [90, 392].

Proces oznaczania stężenia ATP ogólnego z zastosowaniem luminometru wykonano zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Objętość 100 μl badanej próby oraz 100 μl odczynnika BacTiter-Glo™ Substrate + BacTiter-Glo™ Buffer inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 sekund. Tak przygotowaną próbkę mieszano ruchem wirowym, a następnie umieszczano w luminometrze w celu odczytania RLU (Relative Light Unit – względne jednostki świetlne). Pomiar przeprowadzano do momentu pojawienia się na ekranie luminometru ostatniego najwyższego wyniku. Najwyższy wynik odnotowano. Do oznaczania stężenia ATP zewnątrzkomórkowego przed oznaczeniem w luminometrze filtrowano 1 cm^3 próby przez filtr strzykawkowy (MCE 1.2 μm , 25 mm).

Oznaczenie ogólnej liczby mikroorganizmów występujących w badanych ściekach przeprowadzono metodą cytometrii przepływowej. Komórki zliczano przy użyciu cytometru przepływowego Partec Cube 6 (Sysmex-Partec) wyposażonego w niebieski laser 488 nm, detektor rozpraszania w przód (FSC), detektor rozpraszania bocznego (SSC) i trzy detektory fluorescencji (FL1-536 \pm 20 nm, FL2 -590 \pm 25 nm, FL3N 615 nm). Do oznaczeń wykorzystano barwnik SybrGreen oraz zestaw odczynników TM BacCount Viable. Barwnik fluorescencyjny SYBRGreen I (10 000 x rozcieńczony w DMSO) doskonale nadaje się do wzbudzenia niebieską linią lasera argonowego przy 488 nm. W celu określenia skuteczności przeprowadzanych procesów dezynfekcji: promieniowania UV oraz ozonowania, zastosowano przeznaczony do nieswoistego zliczania wszystkich bakterii (ogólnej liczby komórek) w tym zliczania żywych

i martwych bakterii, zestaw dwóch odczynników TM BacCount Viable. Składa się on z dwóch zestawów barwników: SYBRGreen oraz CyStein™ Red. Zgodnie z metodyką producenta barwnik CyStein™ Red służy jako wskaźnik komórek martwych:

LNA (Reg. 1) – wskaźnik komórek martwych; oznacza liczbę mikroorganizmów o niskiej zawartości kwasu nukleinowego, m.in. wirusy lub fragmenty materiału genetycznego mikroorganizmów.

HNA (Reg. 2) – wskaźnik komórek żywych; wysoki kwas nukleinowy oznacza liczbę mikroorganizmów o dużej zawartości kwasu nukleinowego, głównie bakterii.

W niektórych seriach badawczych wydzielono 3 regiony populacji bakteryjnych, które zostały zinterpretowane jako:

- Region 1 – zlokalizowany najbliżej zera na osi x:FL1 – bakterie martwe (LNA) – mogą wykazywać niższy poziom fluorescencji FL1, ponieważ ich zawartość kwasów nukleinowych jest zwykle niższa.
- Region 2 – bakterie uszkodzone – mogą wykazywać poziom fluorescencji FL1 pomiędzy bakteriami żywymi a martwymi, ponieważ mogą mieć częściowo zniszczone kwasy nukleinowe.
- Region 3 – najdalej odsunięty od zera na osi x:FL1 – bakterie żywe (HNA) – zwykle wykazują wyższy poziom fluorescencji FL1, ponieważ zawierają więcej kwasów nukleinowych, które mogą być barwione i emitować fluorescencję.

Ze względu na dużą ilość ładunków w badanych ściekach próbki rozcieńczono do stężenia $10^{-1/2}$ cm³. Każdorazowo objętość próbki wynosiła 50 µl, czas przepływu 60 sek., natężenie przepływu 0,5 µl/sek., a obciążenie, dzięki zastosowanym rozcieńczeniom, wahało się od 1 do 3 kPart/sek.

Zastosowano zalecaną przez producenta analizę danych i strategię bramkowania:

- Utworzono 2 histogramy w skali logarytmicznej: H1: SSC, H4: FL1 (zielona fluorescencja).
- Utworzono 2 wykresy punktowe w skali logarytmicznej: P1 (FL1 zielona fluorescencja) vs. (FL3 czerwona fluorescencja) oraz P3 (FL1 zielona fluorescencja) vs. SSC.
- Utworzono 3 wielokątne obszary bramkowania na populacji komórek bakteryjnych: „PG1” FL1 vs. FL3 (żywotne bakterie) oraz „PG2” FL1 vs. SSC (bakterie LNA) oraz „PG3” FL1 vs. SSC (bakterie HNA).

3. Wyniki badań i ich omówienie

3.1. Parametry fizykochemiczne ścieków oczyszczonych

Wyniki jakości fizykochemicznej ścieków oczyszczonych zestawiono w tabeli 13 (zał. 2 i 3).

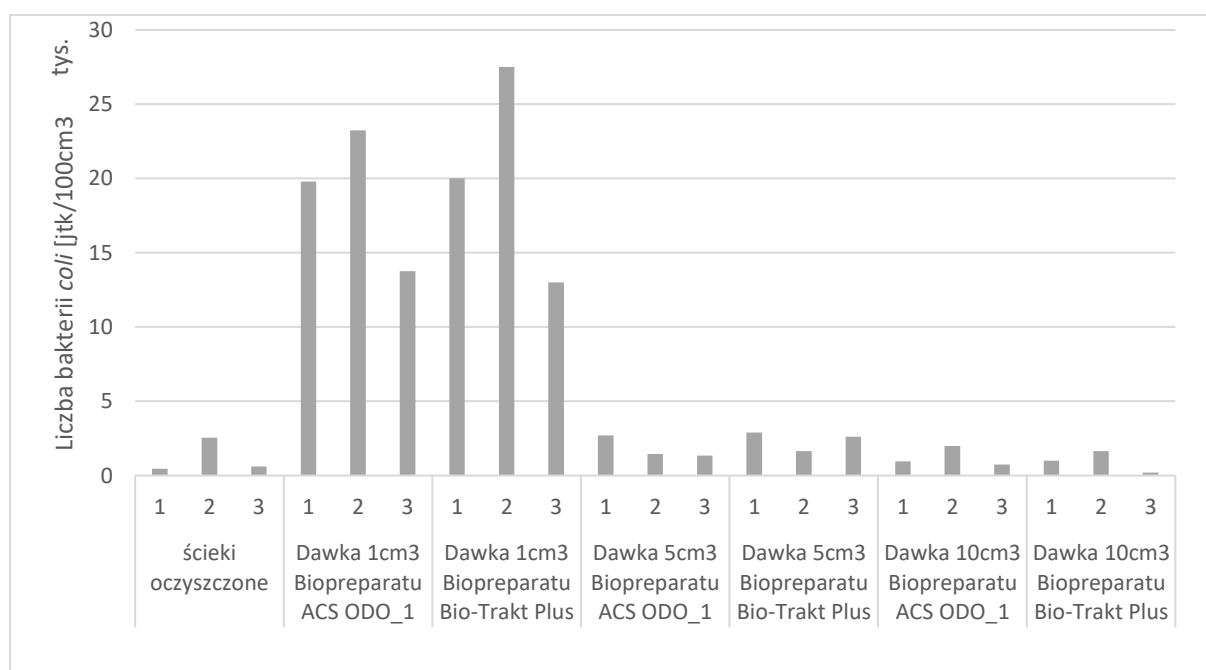
Tabela 13. Parametry ścieków oczyszczonych; załącznik 2 i 3

Parametr	Oczyszczalnia Rzeszów		Oczyszczalnia Tarnobrzeg	
	min	max	min	max
azot ogólny [mg/dm ³]	6,1	9,4	11,5	14,93
fosfor ogólny [mg/dm ³]	0,36	1,28	0,13	1,97
ChZT [mg/dm ³]	37,9	47,6	25,4	84,1
BZT ₅ [mg/dm ³]	3,3	10,1	2,1	5,6
zawiesina ogólna [mg/dm ³]	5,8	18,1	2,0	12,5
odczyn pH	6,6	7,2	7,63	7,85
barwa [mg/dm ³ Pt]	24	50	45	51
mętność [NTU]	1,54	4,05	0,91	2,75

3.2. Wykorzystanie biopreparatów w higienizacji ścieków oczyszczonych

3.2.1. Wpływ dawki zastosowanego biopreparatu na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* ze ścieków oczyszczonych

Liczebność bakterii *coli* w ściekach oczyszczonych wynosiła min 2×10^2 jtk/100 cm³ i max 3×10^3 jtk/100 cm³.



Wykres 2. Liczebność bakterii *coli* w zależności od dawki biopreparatu, uśrednione wyniki z badań realizowanych w kolejnych seriach (1–3); załącznik 4

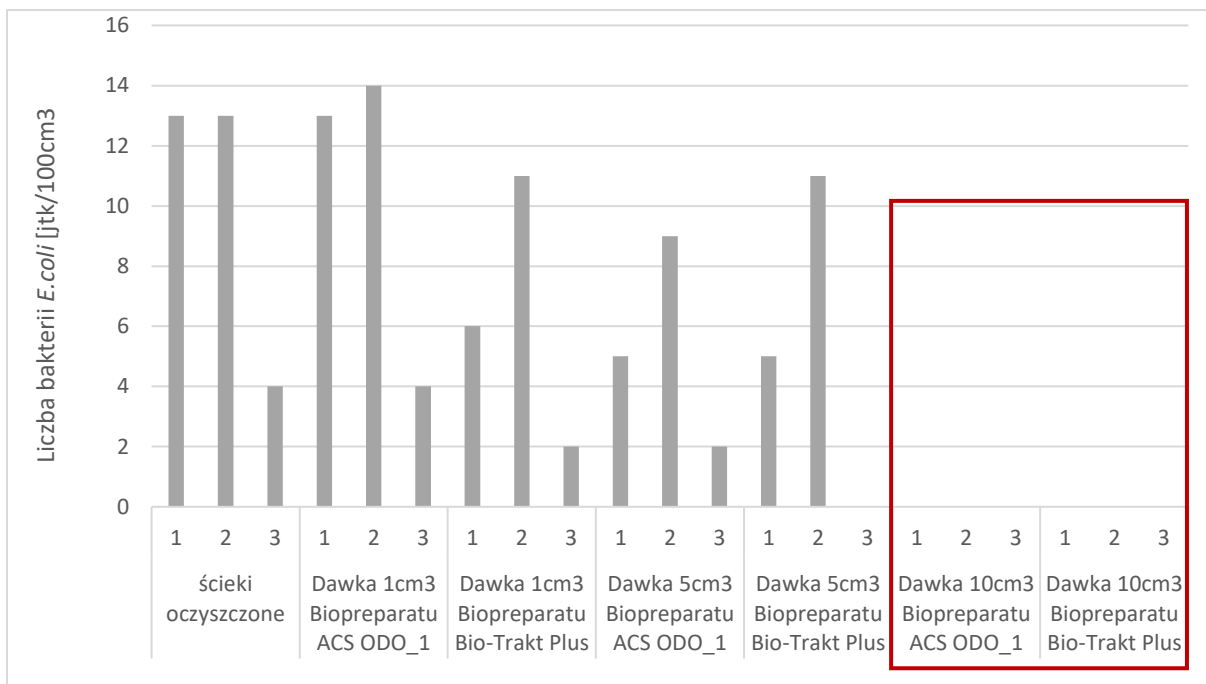
Dawka biopreparatu – 1 cm³, wpłynęła na wzrost liczebności bakterii *coli* po 24 godzinach oddziaływania zarówno biopreparatu ACS ODO_1, jak i Bio-Trakt Plus. Wartości te wynosiły kolejno: min 1x10⁴ jtk/100cm³ i max 3,6x10⁴ jtk/100cm³ dla biopreparatu Bio-Trakt Plus oraz min 1,2x10⁴ jtk/100cm³ i max 2,9x10⁴ jtk/100cm³ dla biopreparatu ACS ODO_1. Zwiększenie dawki do 5cm³ biopreparatu/1dm³ ścieków oczyszczonych spowodowało spadek liczebności bakterii *coli* w próbach kolejno: min 2,1x10² jtk/100cm³ oraz max 5x10³ jtk/100cm³ i dla biopreparatu Bio-Trakt Plus oraz min 1,9x10² jtk/100cm³ oraz 2,71x10³ jtk/100cm³ dla biopreparatu ACS ODO_1.

Dawka 10 cm³ wpłynęła na obniżenie liczebności bakterii *coli* tylko w trzeciej serii badania. Średnia liczebność bakterii *coli* w próbach z biopreparatem ACS ODO_1 w serii 2 wynosiła 1,985x10³ jtk/100cm³, natomiast w próbach z biopreparatem Bio-Trakt Plus 1,645x10³ jtk/100cm³. W próbach kontrolnych odnotowano uśrednioną wartość wynoszącą 2,55x10³ jtk/100cm³ w serii 3. Liczba bakterii *coli* przez cały czas badania utrzymywała się na poziomie wyższym niż 100 jtk/100cm³. W żadnej serii badań nie udało się zredukować liczby bakterii *coli* w stopniu pozwalającym na stwierdzenie, że uzyskano efekt ich eliminacji (wykres 2).

W przypadku bakterii *Escherichia coli* ich liczebność w próbce kontrolnej wynosiła max 2,5x10¹ jtk/100cm³ (średnio 1,3x10¹ jtk/100cm³) i min 0 jtk/100cm³. Dodanie biopreparatu do ścieków nie spowodowało znaczącej zmiany liczebności tych bakterii:

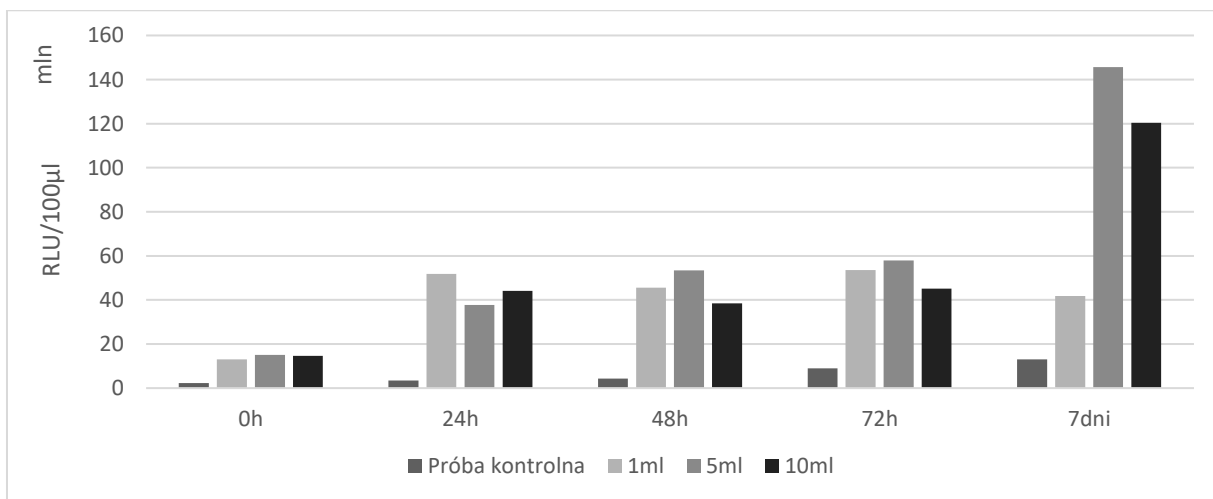
- dla dawki 1cm³ biopreparatu/1dm³ odnotowano kolejno: min. 0 jtk/100cm³ i max 1,6x10¹ jtk/100cm³ i dla biopreparatu Bio-Trakt Plus oraz min 3 jtk/100cm³ i max 1,8x10¹ jtk/100cm³ i dla biopreparatu ACS ODO_1,
- dla dawki 5 cm³ biopreparatu/1dm³ odnotowano kolejno: min 0 jtk/100cm³ i max 2x10¹ jtk/100cm³ i dla biopreparatu Bio-Trakt Plus oraz min 1 jtk/100cm³ i max 1,5x10¹ jtk/100cm³ i dla biopreparatu ACS ODO_1.

Dawka 10cm³ biopreparatów zastosowana w 1dm³ ścieków oczyszczonych okazała się być dawką optymalną do zahamowania rozwoju bakterii *E. coli* w ściekach: nie dopuściła do wzrostu ich liczby. Dawka 10 cm³ spowodowała znaczące obniżenie liczebności tych bakterii w poszczególnych seriach, kolejno: z 1,3x10¹ jtk/100cm³ (ścieki oczyszczone) do 2 jtk/100cm³ (po dodaniu 10 cm³ biopreparatu) w serii 1 oraz z 2,5x10¹ jtk/100cm³ do 0 jtk/100cm³ w serii 2 oraz z 5 jtk/100cm³ do 0 jtk/100cm³ w serii 3, dla biopreparatu Bio-Trakt Plus oraz z 1,3x10¹ jtk/100cm³ (ścieki oczyszczone) do 0 jtk/100cm³ (po dodaniu 10 cm³ biopreparatu) w serii 1 oraz z 2,5x10¹ jtk/100cm³ do 1 jtk/100cm³ w serii 2, a także z 5 jtk/100cm³ do 0 jtk/100cm³ w serii 3, dla biopreparatu ACS ODO_1 (wykres 3).



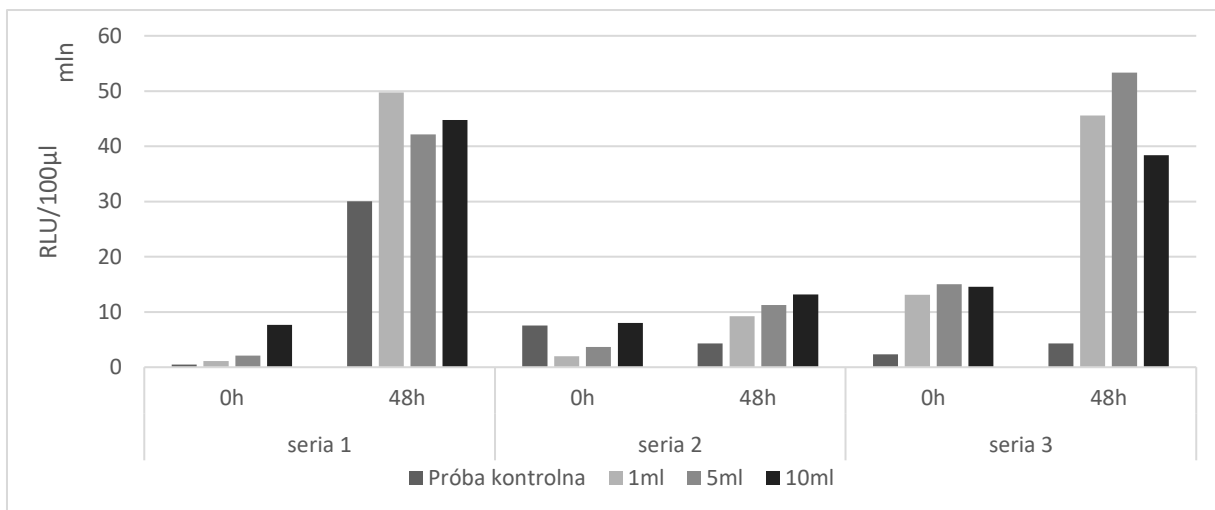
Wykres 3. Liczebność bakterii *E. coli* w zależności od dawki biopreparatu, uśrednione wyniki z badań realizowanych w kolejnych seriach (1–3); załącznik 4

Najwyższe wartości RLU w kolejnych dniach badania charakteryzują próbę 5cm³ biopreparatu/1dm³ ścieków (po upływie 48h od momentu zadawkowania biopreparatu do ścieków) (wykres 4).



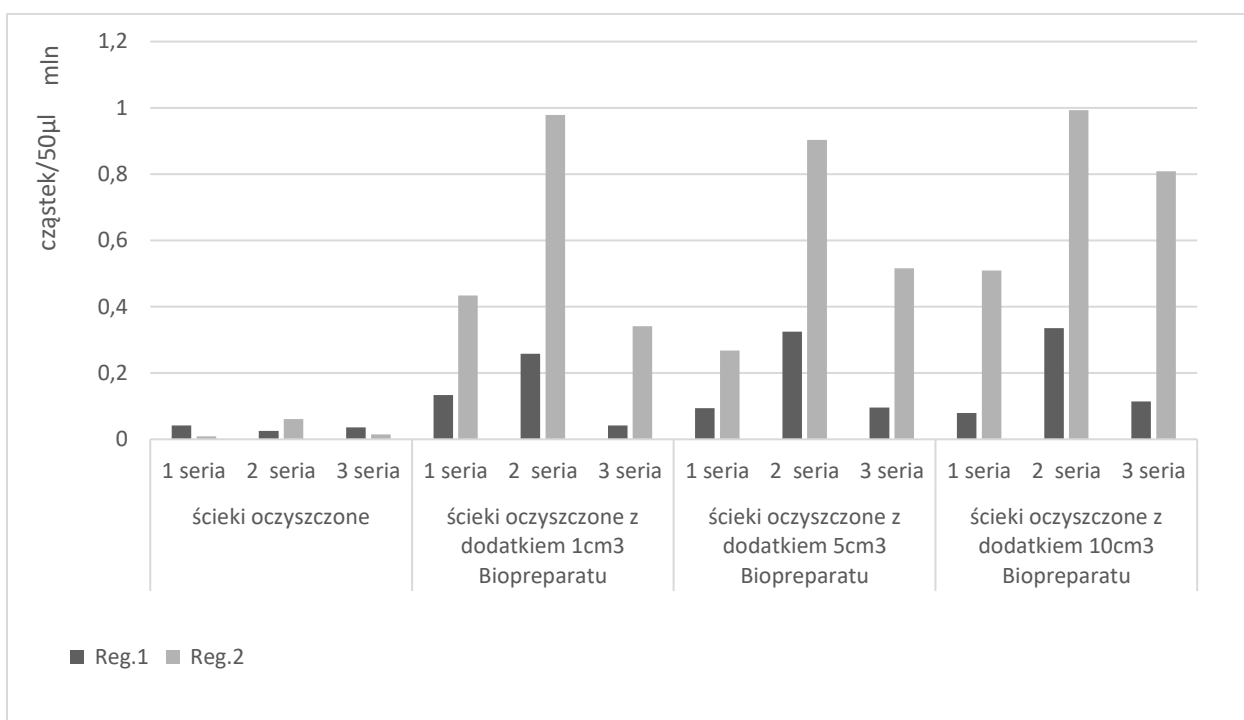
Wykres 4. Zmiany wartości RLU w czasie 7 dni badania wpływu dawki biopreparatu na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli*; załącznik 5

Po 48h od dodania kolejnych dawek biopreparatu do ścieków nie odnotowano znaczącej różnicy między dawką 5 a 10 cm³. W dwóch pierwszych seriach badań wartości RLU dla próby 5 cm³ były zbliżone, natomiast w 3 serii badań wartość RLU dla próby 5 cm³ była wyższa niż wartość RLU dla próby 10 cm³ (wykres 5).



Wykres 5. Zmiany wartości RLU w badaniu wpływu dawki biopreparatu na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* po 48h; załącznik 6

Analiza cytometryczna dla każdej serii potwierdziła rozwój mikroorganizmów pochodzących z biopreparatu, o czym świadczy gwałtowny wzrost populacji regionu 2 – żywych mikroorganizmów (wykres 6).

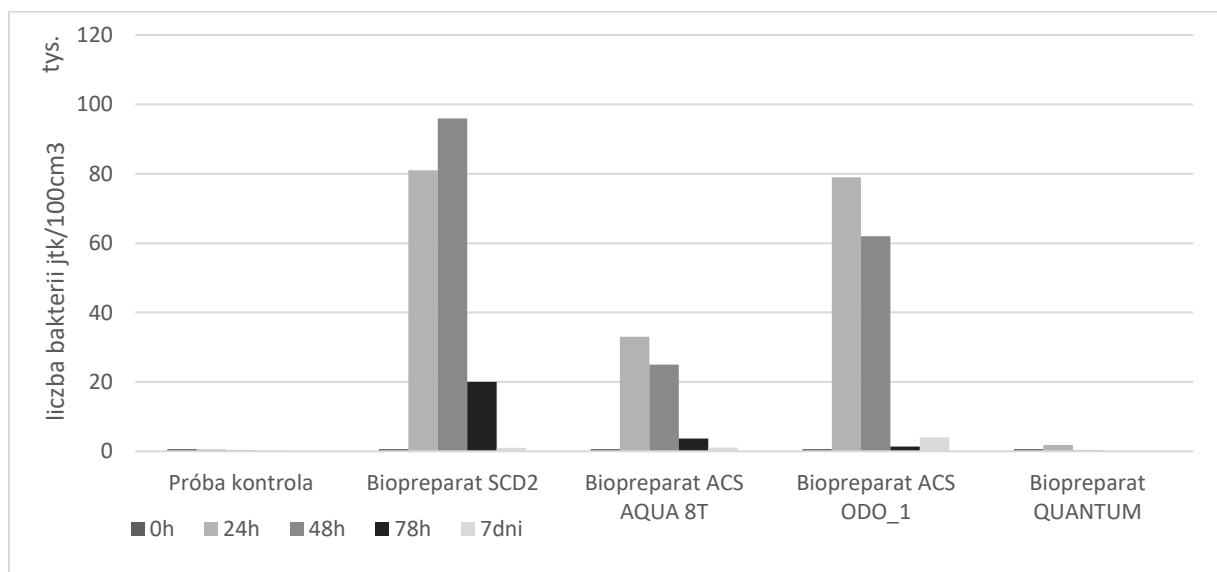


Wykres 6. Analiza FCM dla prób z zastosowaniem biopreparatu Bio-Trakt Plus w dawkach 1, 5 i 10 cm³ oraz w próbie kontrolnej; załącznik 7

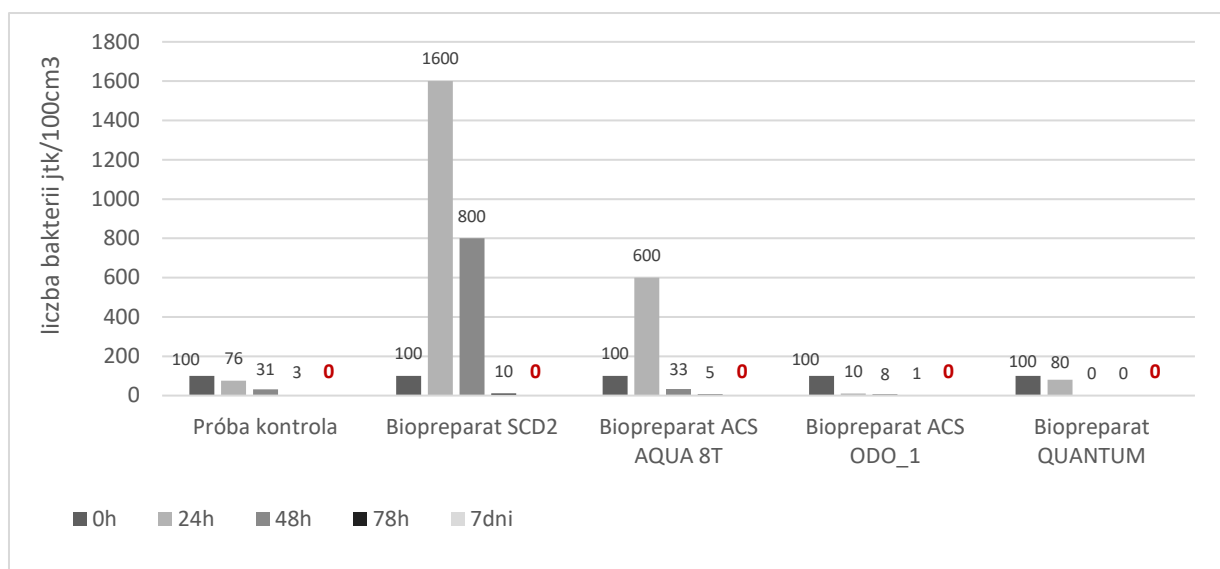
3.2.2. Wpływ czasu działania biopreparatu na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* ze ścieków oczyszczonych

Największe liczebności bakterii *coli* i *E. coli* zaobserwowano po 24 h od zadawkowania biopreparatów do ścieków oczyszczonych. Po 48h wartości zaczęły spadać. Najwyższą skuteczność działania odnotowano w próbach z biopreparatem QUANTUM (wykres 7). Zauważono wzrost liczebności bakterii *coli* po 24h od zadawkowania biopreparatu, jednak w kolejnych dniach trwania eksperymentu ich liczebność w próbach zaczęła spadać ($6,6 \times 10^2$ jtk/100cm³ w ściekach oczyszczonych, a następnie: $1,8 \times 10^3$ jtk/100cm³ po 24h, $2,4 \times 10^2$ jtk/100cm³ po 48h, 1jtk/100cm³ po 72h i $2,5 \times 10^1$ jtk/100cm³ po 7 dniach). Tylko ten biopreparat nie stymulował bakterii *coli* do dalszego wzrostu, a ich liczebność zaczęła się utrzymywać na poziomie zbliżonym do próby kontrolnej (ścieków oczyszczonych).

W przypadku bakterii *E. coli* 7 dni wystarczyło do całkowitego zahamowania ich wzrostu – dla wszystkich prób liczebność bakterii *E. coli* po upływie 7 dni wynosiła 0 jtk/100cm³ (brak bakterii *E. coli* w próbach odnotowano już po upływie 48h, a efekt higienizacji utrzymał się do 7 dnia badania).



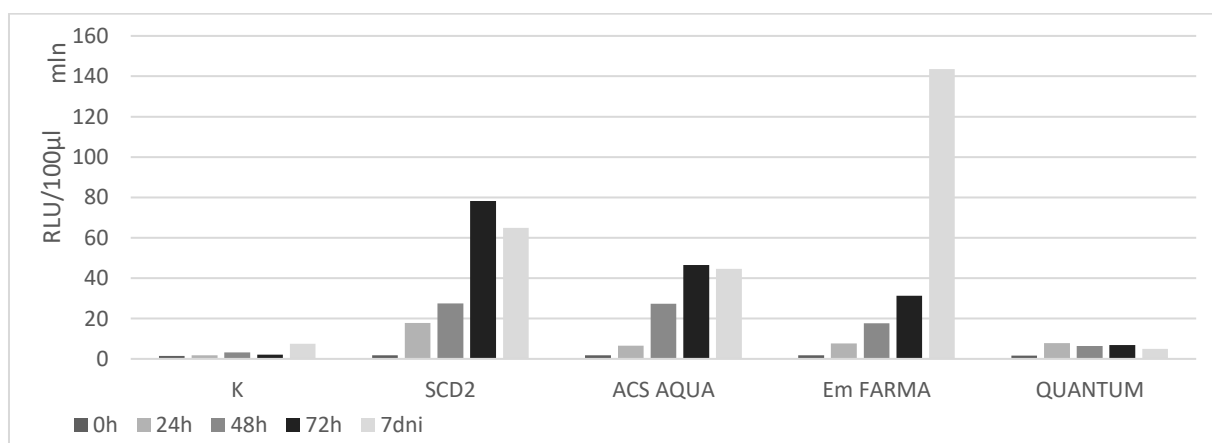
Wykres 7. Liczba bakterii *coli* w próbie kontrolnej i w próbach z biopreparatami; załącznik 8



Wykres 8. Liczba bakterii *E.coli* w próbach kontrolnej i w próbach z biopreparatami w kolejnych godzinach doświadczenia; załącznik 8

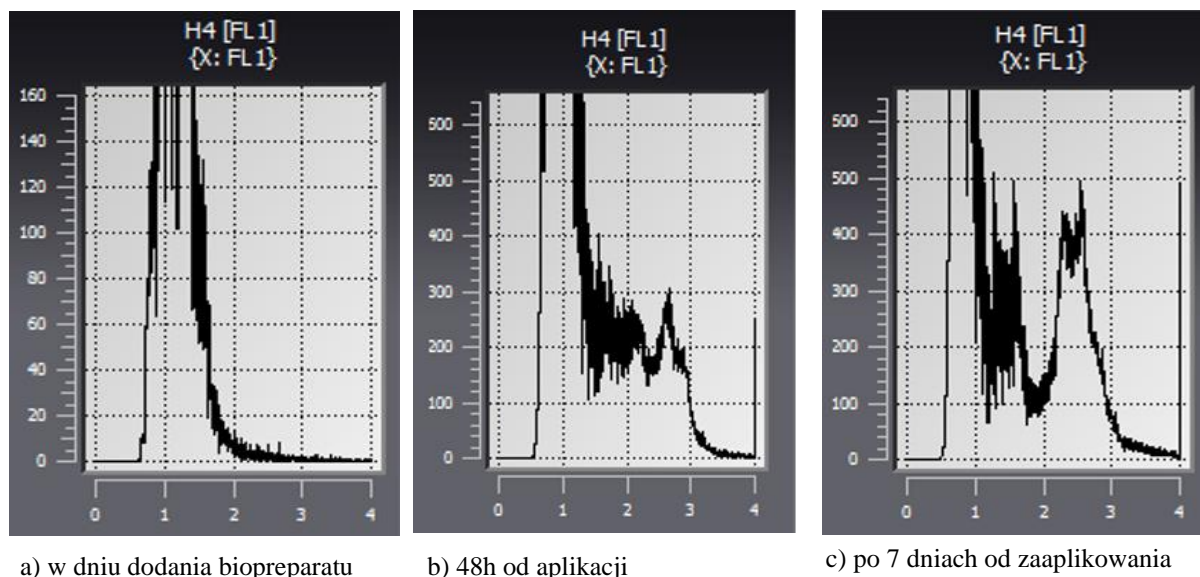
Spadek liczebności bakterii *coli* i *E. coli* w ściekach zaobserwowano po 48h od nastawienia prób z biopreparatami. W przypadku bakterii *coli* wyjątek stanowił biopreparat SCD2, gdzie zauważalny spadek liczebności bakterii nastąpił dopiero po 72h. Dodatkowo dla biopreparatu SCD2 odnotowano najwyższy efekt stymulujący wzrost liczebności bakterii – najwyższe wartości zarówno dla bakterii *coli*, jak i *E. coli*. Najskuteczniejsze okazały się biopreparaty ACS ODO_1 i QUANTUM, charakteryzujące się podobnymi wynikami (wykresy 7 i 8).

W pierwszych dniach działania biopreparatu (do 72h) zaobserwowano wzrost wartości RLU w analizowanych próbach, a następnie ich stopniowy spadek. Wyjątek stanowi próba z dodatkiem biopreparatu Em FARMA, gdzie najwyższy wzrost wartości RLU nastąpił dopiero siódmego dnia od aplikacji biopreparatu (wykres 9).



Wykres 9. Zmiany wartości RLU w badaniu wpływu czasu na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* ze ścieków oczyszczonych; załącznik 9

Poniższe rysunki (8a-c) prezentują obraz histogramu (wykres logarymiczny H4:FL1 – zielona fluorescencja) ścieków oczyszczonych w dniu dodania biopreparatu ACS AQUA po 48h oraz po 7 dniach od aplikacji. Widoczne na wykresach przesunięcie pików populacji bakteryjnej stanowi potwierdzenie rozwoju mikroorganizmów pochodzących z biopreparatu.



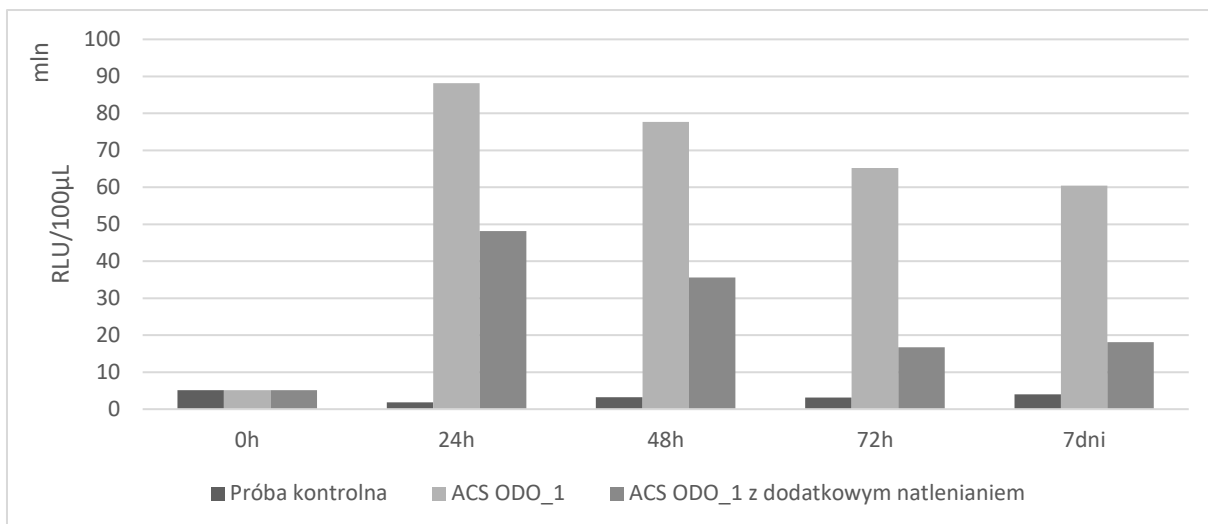
Rysunek 8 a-c. Analiza FCM ścieków oczyszczonych

3.2.3. Wpływ dodatkowego natleniania na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* ze ścieków oczyszczonych

W próbie kontrolnej liczba bakterii z grupy *coli* wynosiła min 3×10^1 jtk/100cm³ i max $1,1 \times 10^4$ jtk/100cm³ i w zależności od serii. Wprowadzenie biopreparatu nie przyniosło pożądanego skutku – w żadnej z prób liczba bakterii *coli* nie uległa zmniejszeniu, w związku z czym nie uzyskano zakładanego efektu higienizacji ścieków. W próbach z biopreparatem ACS ODO_1 z dodatkowym napowietrzaniem zaobserwowano bardzo intensywny rozwój bakterii *coli* w porównaniu z próbą kontrolną:

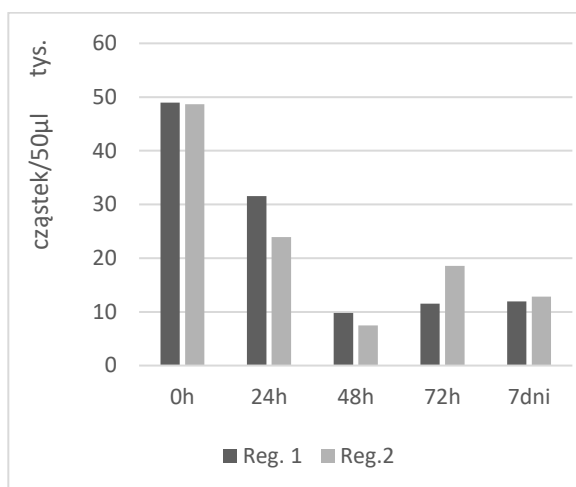
- Biopreparat ACS_ODO1 z dodatkowym natlenianiem – min 3×10^3 jtk/100cm³ i max $1,4 \times 10^6$ jtk/100cm³.
- Biopreparat ACS_ODO1 z ograniczonym dostępem tlenu – min $9,2 \times 10^2$ jtk/100cm³ i max $1,3 \times 10^6$ jtk/100cm³ (załącznik 10).

Analiza stężenia ATP wykazała, że zastosowanie biopreparatu ACS ODO_1 bez dodatkowego natlenienia powoduje intensywniejszy rozwój mikroflory (wykres 10).

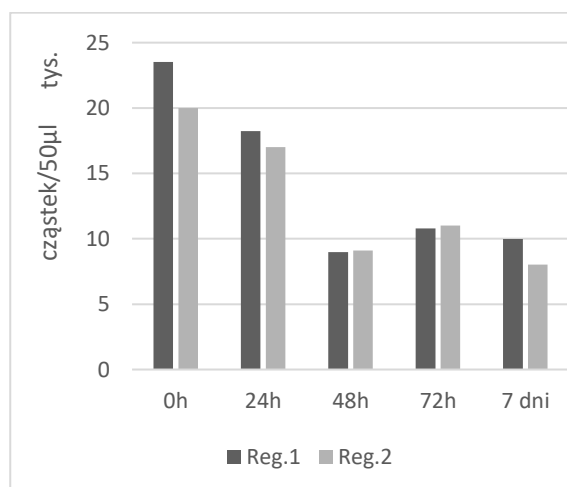


Wykres 10. Zmiany wartości RLU w próbach z zastosowaniem biopreparatów: ACS ODO_1, ACS ODO_1 z dodatkowym natlenianiem oraz w próbie kontrolnej; załącznik 11

Analiza FCM potwierdza wyniki uzyskane metoda luminometryczną. Wyższą liczebność cząstek odnotowano w próbach z ograniczonym dostępem tlenu (max kolejno: niemal 49 tys. cząstek/50µl dla regionu 1 i ponad 48 tys. cząstek/50µl dla regionu 2), przy czym dla prób z dodatkowym natlenianiem maksymalna liczebność była mniejsza niemal o połowę: 23,5 tys. cząstek/ 50µl dla regionu 1 i 20 tys. cząstek/ 50µl dla regionu 2 (wykres 11a-b).



a) Próba ODO_1 z ograniczonym dostępem tlenu



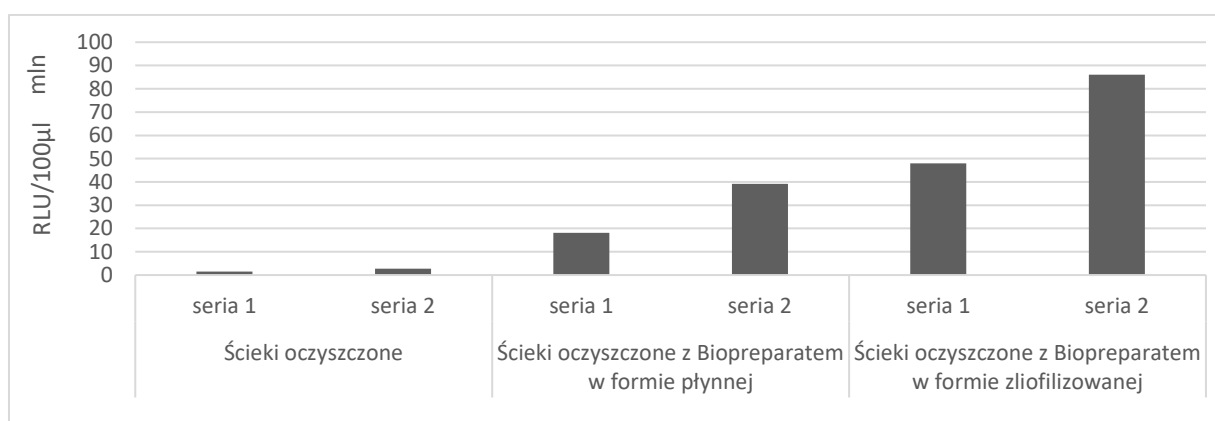
b) Próba ODO_1 z dodatkowym natlenianiem

Wykres 11 a-b. Analiza FCM. Wpływ tlenu na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* ze ścieków oczyszczonych; załącznik 12

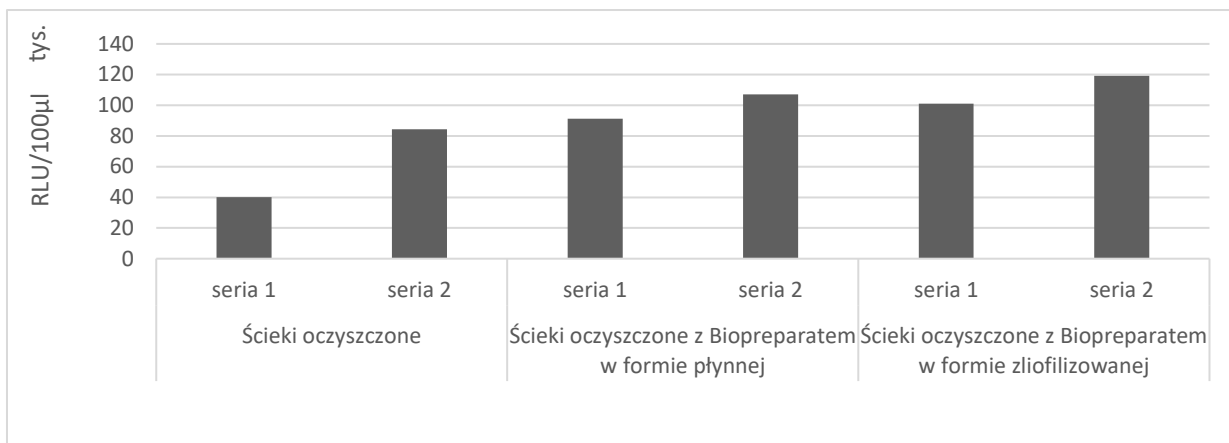
3.2.4. Wpływ formy biopreparatu na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* ze ścieków oczyszczonych

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że forma podania biopreparatu (płynna – bakterie aktywne czy forma liofilizatu) nie ma wpływu na skuteczność działania biopreparatu w kontekście usuwania bakterii *coli* ze ścieków. Po 24 godzinach od zaaplikowania biopreparatu FreeFlow do ścieków liczebność bakterii *coli* wynosiła kolejno: $3,1 \times 10^2$ jtk/100cm³ w ściekach oczyszczonych z dodatkiem biopreparatu w formie liofilizowanej i $3,3 \times 10^2$ jtk/100cm³ w ściekach oczyszczonych z dodatkiem biopreparatu w formie płynnej. Liczebność bakterii *coli* w ściekach oczyszczonych przed aplikacją biopreparatu wynosiła $8,6 \times 10^2$ jtk/100cm³, natomiast po 24 godzinach odnotowano spadek ich liczebności do $1,8 \times 10^2$ jtk/100cm³ (załącznik 13).

Forma, w jakiej aplikowano biopreparat do ścieków, miała wpływ na zmiany wartości RLU w próbach. Wartość RLU ogólnego dla biopreparatu podanego w formie płynnej wynosiła kolejno: 18 mln. RLU/100μl w serii 1 i 40 mln. RLU/100μl w serii 2. Stężenie ATP ogólnego dla ścieków oczyszczonych z dodatkiem biopreparatu w formie liofilizowanej było przy tym niemal dwukrotnie wyższe i wynosiło kolejno: prawie 50 mln RLU/100μl w serii 1 i ponad 85 mln RLU/100μl w serii 2. Świadczy to o tym, że w ściekach z dodatkiem biopreparatu w formie liofilizowanej utrzymało się około 2 razy więcej żywych/nieszkodzonych komórek bakteryjnych. Analiza ATP zewnątrzkomórkowego wykazała porównywalne wielkości wartości RLU (wynoszące średnio między 80 a 120 tys. RLU/100μl) zarówno dla ścieków oczyszczonych, jak i tych z dodatkiem biopreparatu bez względu na formę (wykres 12a-b).



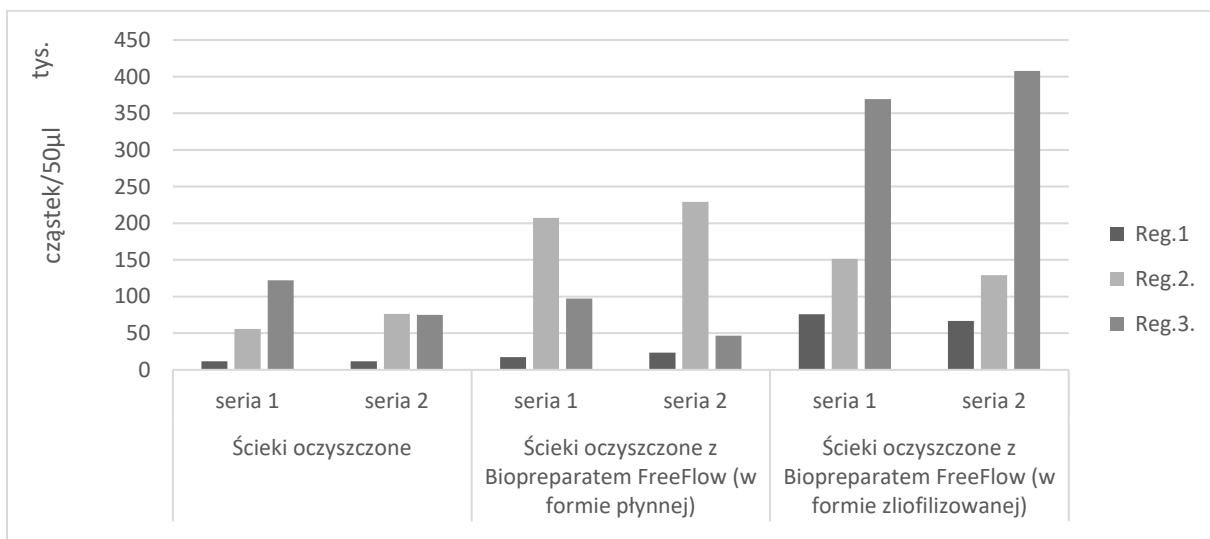
a) ATP ogólne, po upływie 24h



b) ATP zewnątrzkomórkowe, po upływie 24h

Wykres 12 a-b. Zmiany wartości RLU w badaniu wpływu formy aplikacji biopreparatu na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* ze ścieków oczyszczonych; załącznik 14

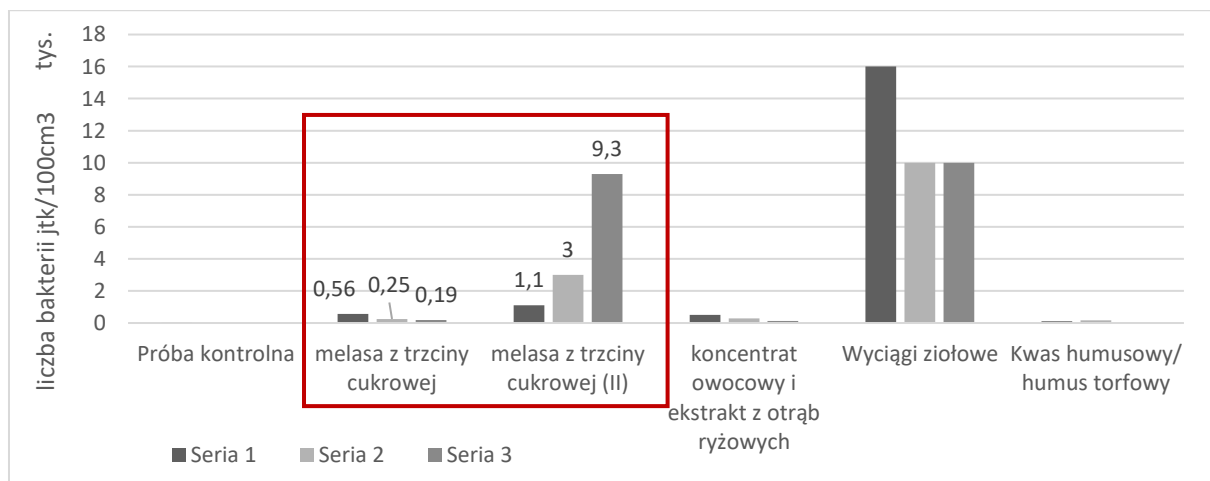
Analiza cytometrii przepływowej koreluje z wynikami analizy luminometrycznej. W ściekach oczyszczonych z dodatkiem biopreparatu FreeFlow w formie zliofilizowanej odnotowano najwyższą wartość regionu 3 (komórek żywych), wynoszącą średnio między 370 a 410 tys. cząstek/50µl. Dla porównania liczba żywych komórek zlokalizowanych w regionie 3 na pozostałych próbach wynosiła kolejno: średnio 99 tys. cząstek/50µl w ściekach oczyszczonych i 72 tys. cząstek/50µl w ściekach oczyszczonych z dodatkiem biopreparatu w formie płynnej (wykres 13).



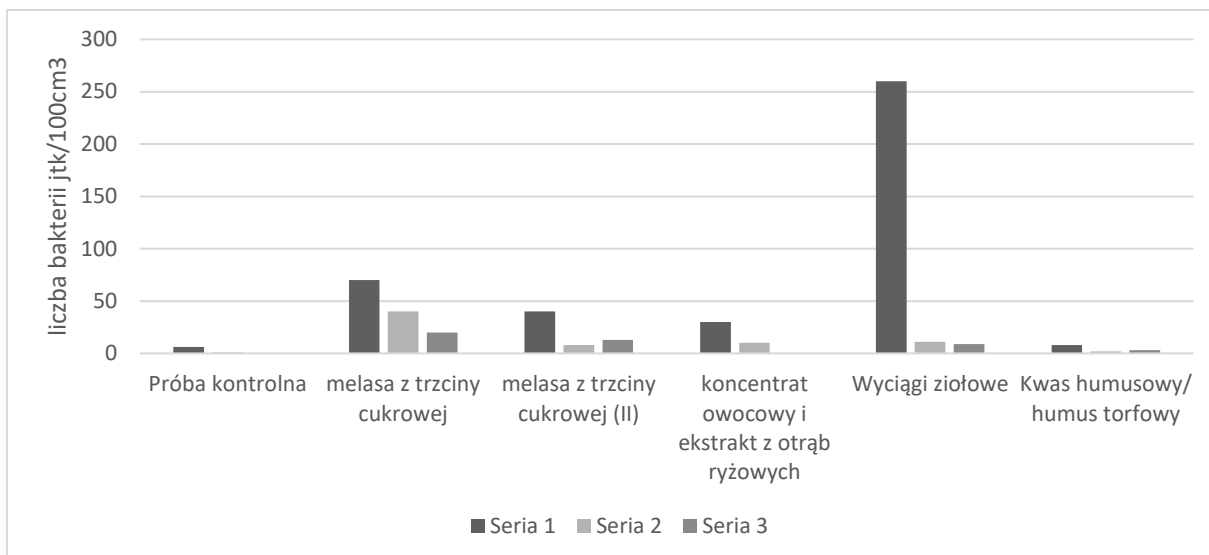
Wykres 13. Analiza FCM. Wpływ formy aplikacji biopreparatu na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* ze ścieków oczyszczonych; załącznik 15

3.2.5. Wpływ podłoża biopreparatu na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* ze ścieków oczyszczonych

W próbie kontrolnej stwierdzono stosunkowo niską liczbę bakterii *coli* i *Escherichia coli*. Dodanie biopreparatów do ścieków poskutkowało wzrostem liczebności bakterii z grupy *coli* i *E. coli* w próbach, tym samym potwierdzono stymulujący wpływ biopreparatów na rozwój bakterii z grupy *coli*. Po analizie wyników można wywnioskować, że najwyższy wzrost liczebności bakterii *coli* charakteryzował próby z dodatkiem biopreparatu na podłożu z wyciągów ziołowych. Wysoką liczebność tych bakterii odnotowano również w przypadku zastosowania pozostałych biopreparatów. Najlepszą skuteczność wykazał biopreparat QUANTUM, czym potwierdzono wyniki z wariantu 2, gdzie podczas badania wpływ czasu działania biopreparatu na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* ze ścieków oczyszczonych biopreparat QUANTUM również wykazał się najwyższą skutecznością. Żaden biopreparat nie spowodował eliminacji bakterii *coli* i *E. coli* ze ścieków, zatem nie osiągnięto zakładanych efektów higienizacji. Na uwagę zasługuje również fakt, że próby z dodatkiem biopreparatu na bazie tego samego podłoża (w omawianym przypadku melasy z trzciny cukrowej) mogą się od siebie diametralnie różnić: $1,9 \times 10^2$ jtk/100cm³, a $9,3 \times 10^3$ jtk/100cm³ w serii 3 (wykres 14a-b).



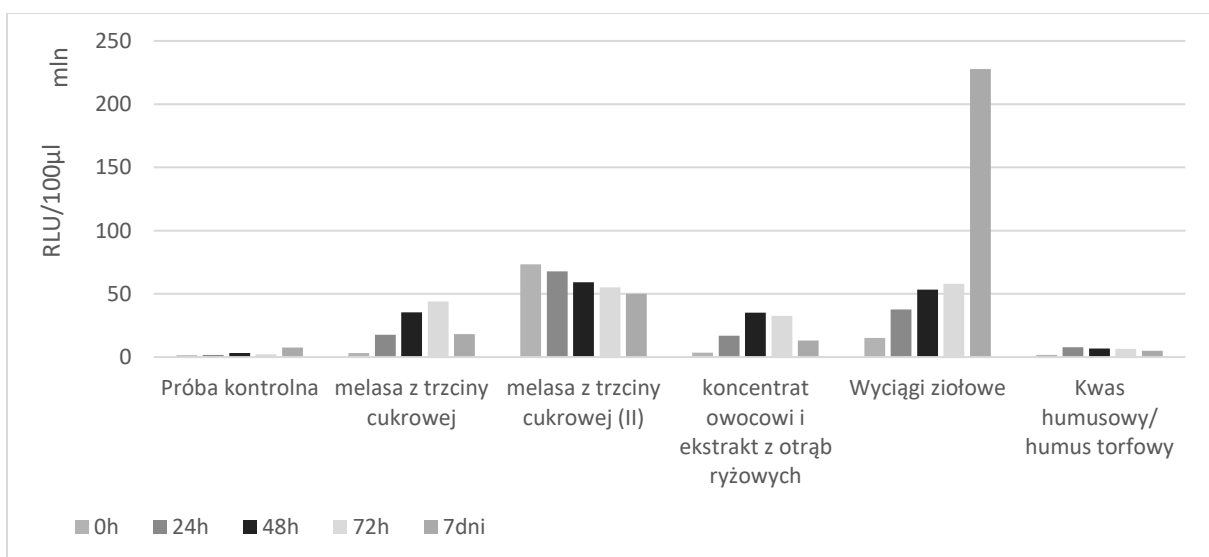
a) Liczebność bakterii z grupy *coli* w próbach



b) Liczebność bakterii z *E. coli* w próbach

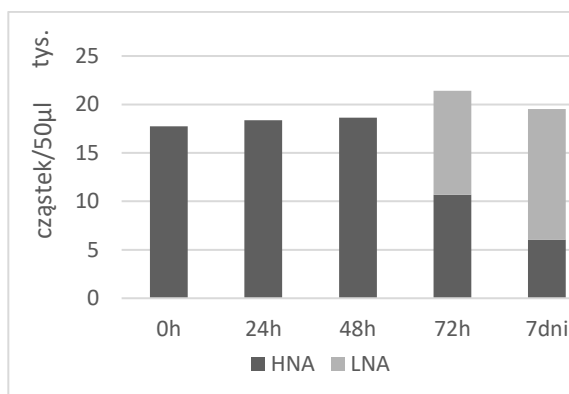
Wykres 14 a-b. Liczebność bakterii *coli* i *E. coli* w próbach po 24h, po rozróżnieniu na podłożu biopreparatu; serie 1–3; załącznik 16

Zmiany wartości RLU w czasie trwania eksperymentu były charakterystyczne dla prób hodowli stałej (z pewnymi wyjątkami). W początkowych dniach badania wartość RLU wynosiła średnio między 1 a 3 mln RLU/100 μ l – wyjątek stanowił biopreparat z podłożem z wyciągów ziołowych: ponad 15 mln RLU/100 μ l oraz biopreparat A6 (melasa z trzciny cukrowej II): ponad 73 mln RLU/100 μ l. W kolejnych dniach eksperymentu wartość RLU rosła, osiągając wartość między 30 a 50 mln RLU/100 μ l. Między 48h a 72h w większości analizowanych prób wartość RLU zaczęła spadać. Najniższe wartości ATP ogólnego odnotowano w próbach z podłożem humusowo-torfowym – wartość RLU była najbardziej zbliżona do próby kontrolnej (wykres 15).

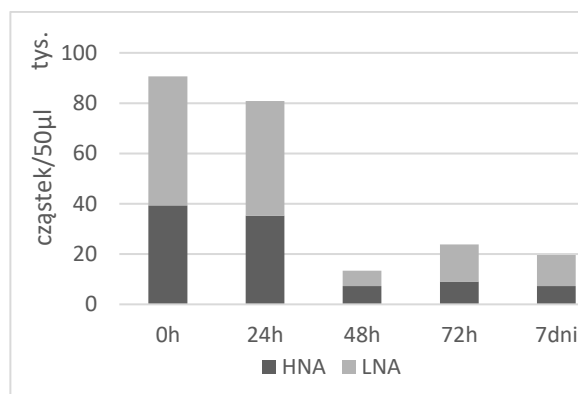


Wykres 15. Zmiany wartości RLU w badaniu wpływu podłoża zastosowanego biopreparatu ma wpływ na skuteczność usuwania bakterii z ścieków oczyszczonych; załącznik 17

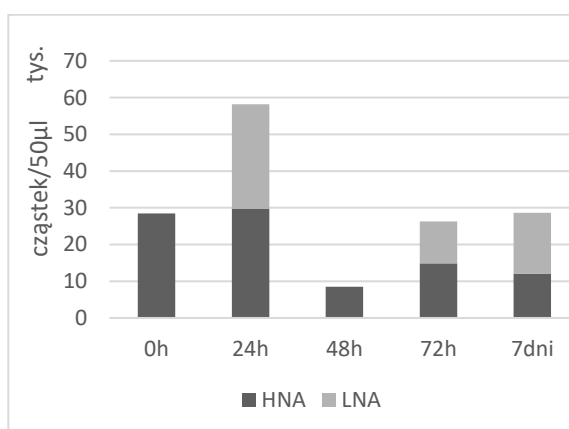
Dodanie biopreparatów do ścieków spowodowało znaczący wzrost liczby komórek martwych i/lub uszkodzonych w każdej próbie. Ponadto analiza FCM wykazała największe podobieństwo próby z podłożem torfowo-humusowym do ścieków oczyszczonych, kolejno: średnio 20 tys. cząstek/50 μ l w próbie kontrolnej i 30 tys. cząstek/50 μ l w próbie z podłożem torfowo-humusowym, gdzie dla innych prób wartości te wynosiły nawet 900 tys. cząstek/50 μ l dla prób z podłożem z wyciągów ziołowych i średnio między 60 a 110 tys. cząstek/50 μ l dla pozostałych prób (wykres 16a-f).



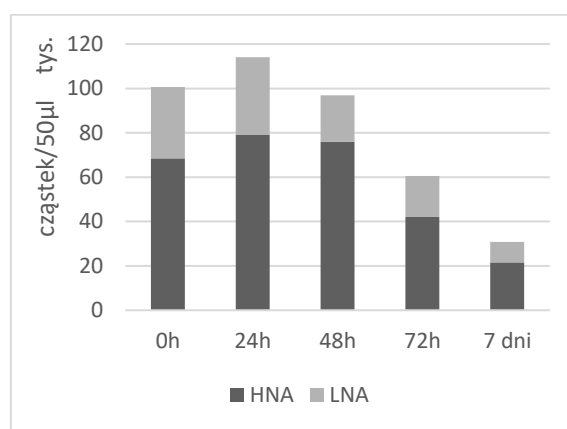
a) Prób kontrolna



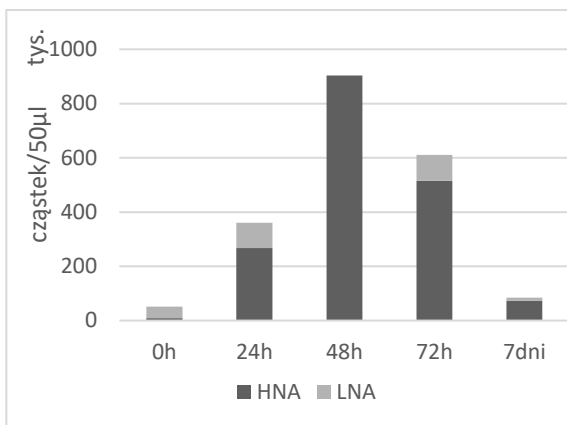
b) Wpływ podłoża z melasy z trzciny cukrowej na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* ze ścieków oczyszczonych



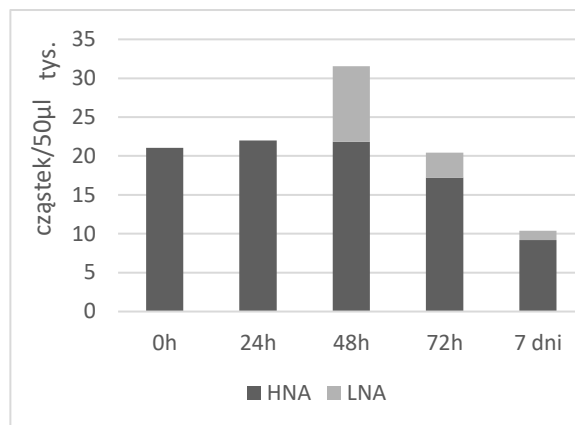
c) Wpływ podłoża z koncentratu owocowego i ekstraktu z otrąb ryżowych na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* ze ścieków oczyszczonych



d) Wpływ podłoża z melasy z trzciny cukrowej (II) na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* ze ścieków oczyszczonych



e) Wpływ podłoża z wyciągów roślinnych na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* ze ścieków oczyszczonych



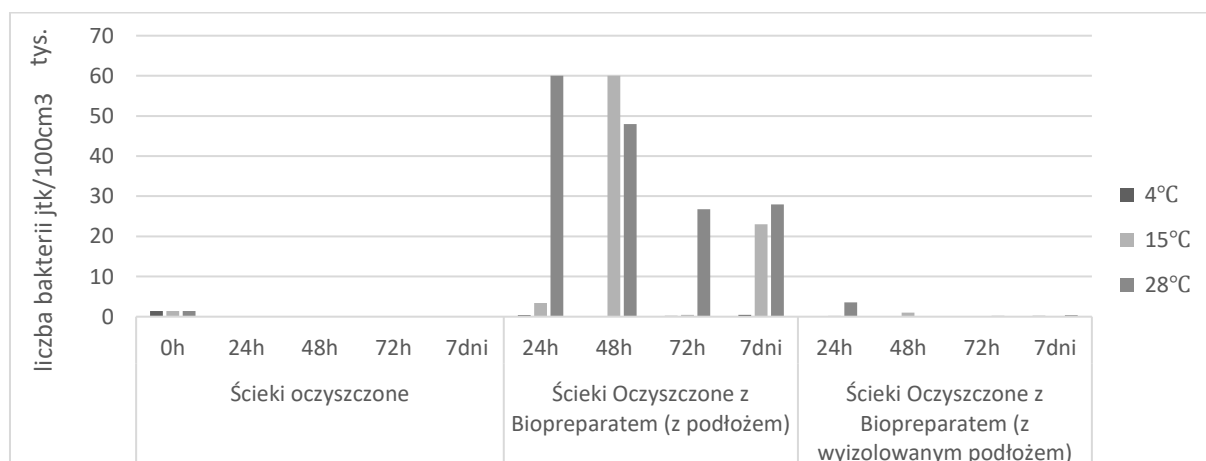
f) Wpływ podłoża z kwasu humusowego na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* ze ścieków oczyszczonych

Wykres 16 a-f. Analiza FCM. Wpływ podłoża zastosowanego biopreparatu na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* ze ścieków oczyszczonych; załącznik 18

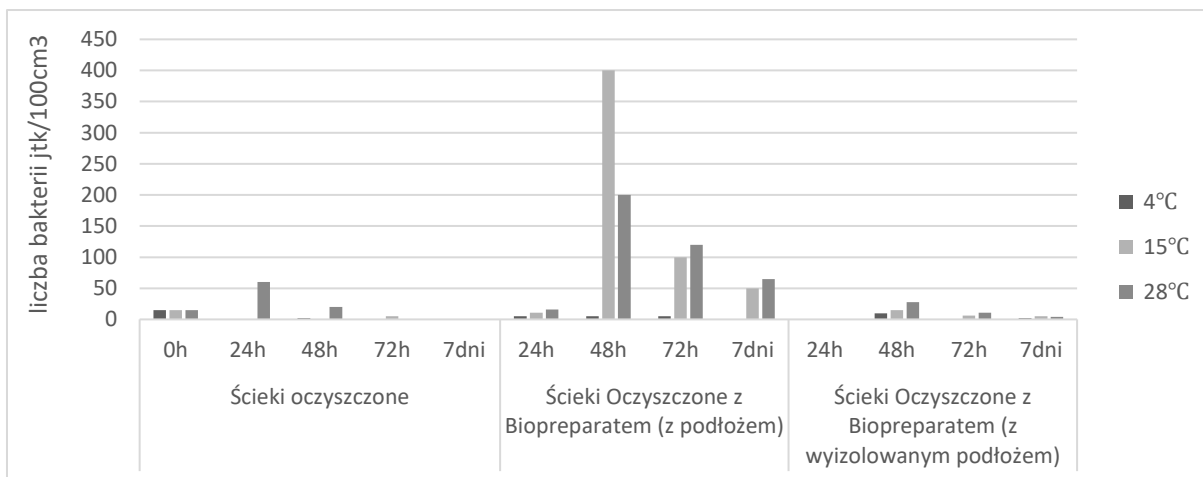
3.2.6. Wpływ mikroorganizmów oddzielonych od podłoża na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* ze ścieków oczyszczonych

Najlepszy efekt higienizacji osiągnięto dla prób ścieków z biopreparatem A7 bez podłoża. Dodatek wyizolowanych mikroorganizmów spowodował spadek liczebności bakterii *coli* w ściekach. Natomiast, w próbach z biopreparatem z podłożem odnotowano wzrost liczebności bakterii *coli* w porównaniu z próbą kontrolną.

Po 48h liczebność bakterii *coli* ponownie wzrosła i utrzymała się do końca czasu trwania eksperymentu. Wraz ze wzrostem temperatury rosła liczebność bakterii *coli*: 2×10^2 jtk/100cm³ dla prób inkubowanych w temp. 15°C i $3,6 \times 10^3$ jtk/100cm³ dla prób inkubowanych w temp. 28°C. (wykres 17a-b).



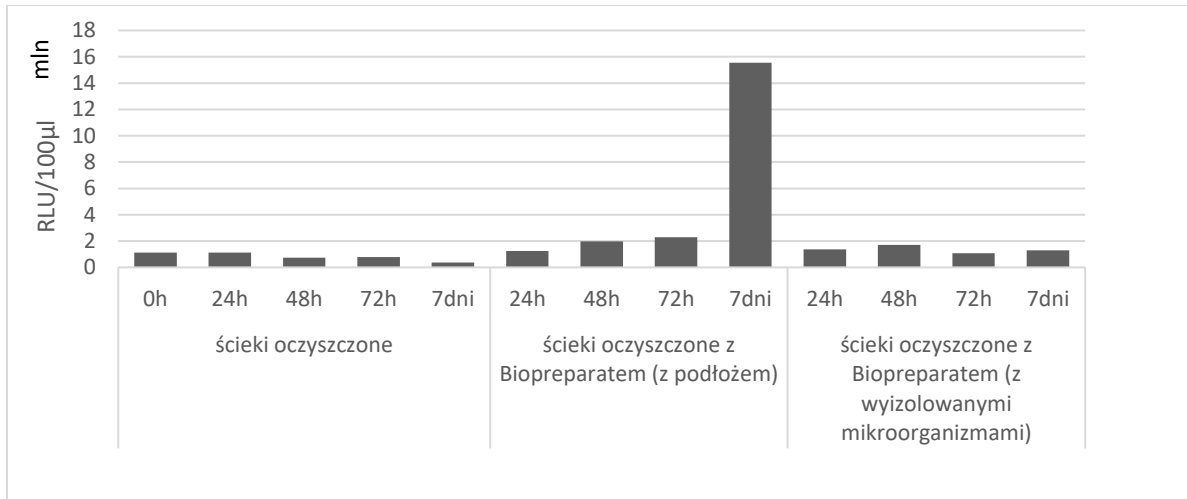
a) Liczebność bakterii *coli* w ściekach oczyszczonych



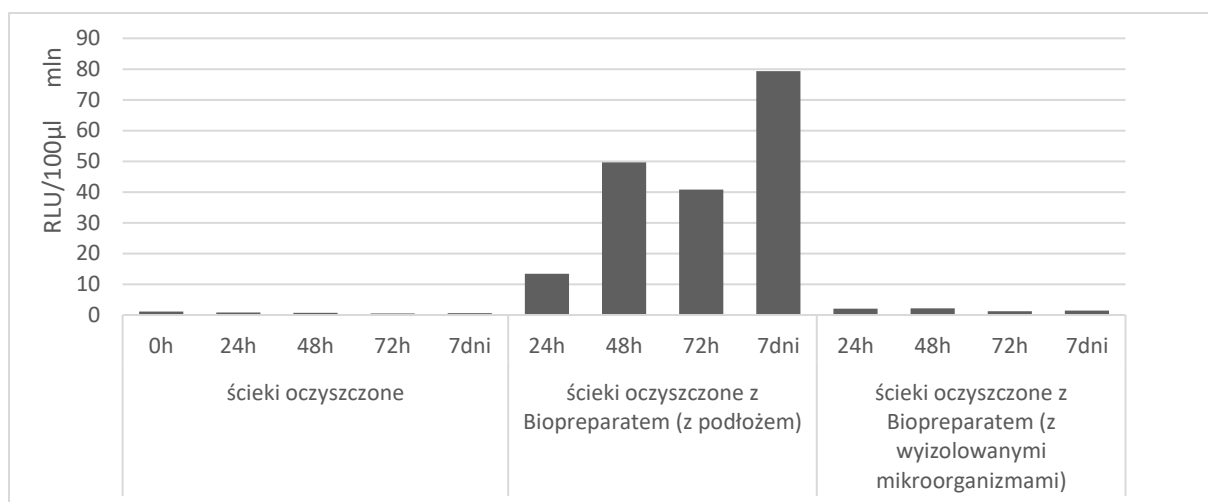
b) Liczebność bakterii *E. coli* w ściekach oczyszczonych

Wykres 17 a-b. Liczebność bakterii *coli* i *E. coli* w ściekach oczyszczonych, wzbogaconych biopreparatem A7 z podłożem oraz z wyizolowanym podłożem, w zależności od temp. 4, 15 i 28°C; załącznik 19

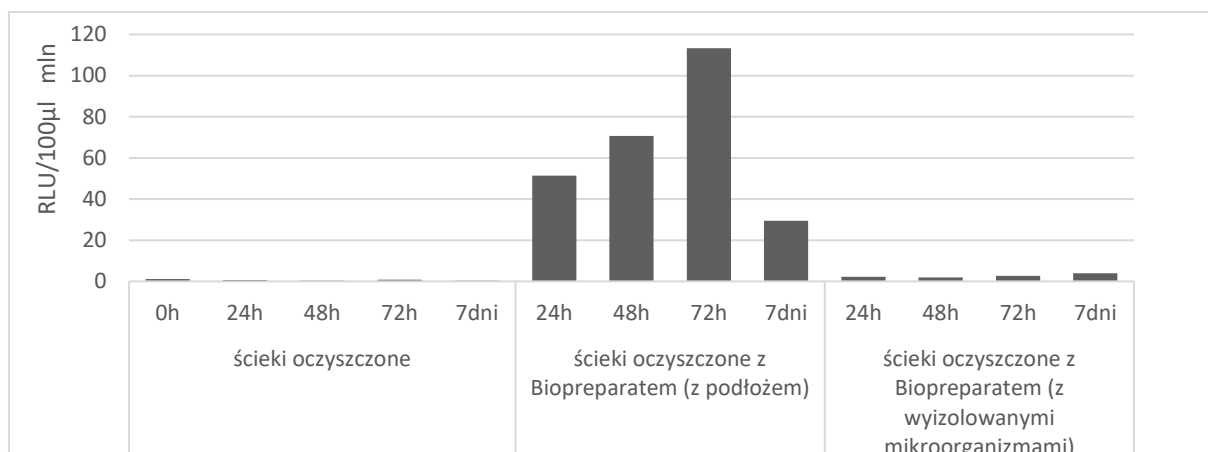
Wartość ATP ogólnego na początku badania wynosiła 1 129 169 RLU/100μl, natomiast ATP zewnątrzkomórkowego 43 786 RLU/100μl. Temperatura 4°C działała hamująco na rozwój mikroorganizmów. Wzrost temperatury spowodował wzrost wartości RLU dla próby ścieków oczyszczonych z biopreparatem aplikowanym wraz z podłożem. W porównaniu z temperaturą 4°C wzrost ten był niemal 40-krotny (wykres 18a-c).



a) ATP ogólne, temp. 4°C



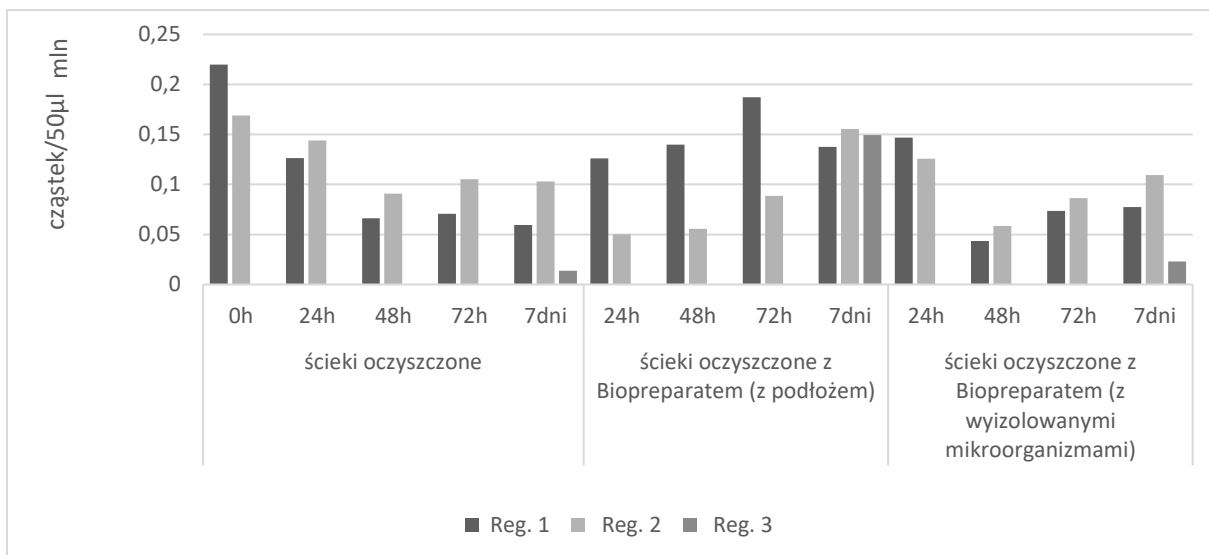
b) ATP ogólne, temp. 15°C



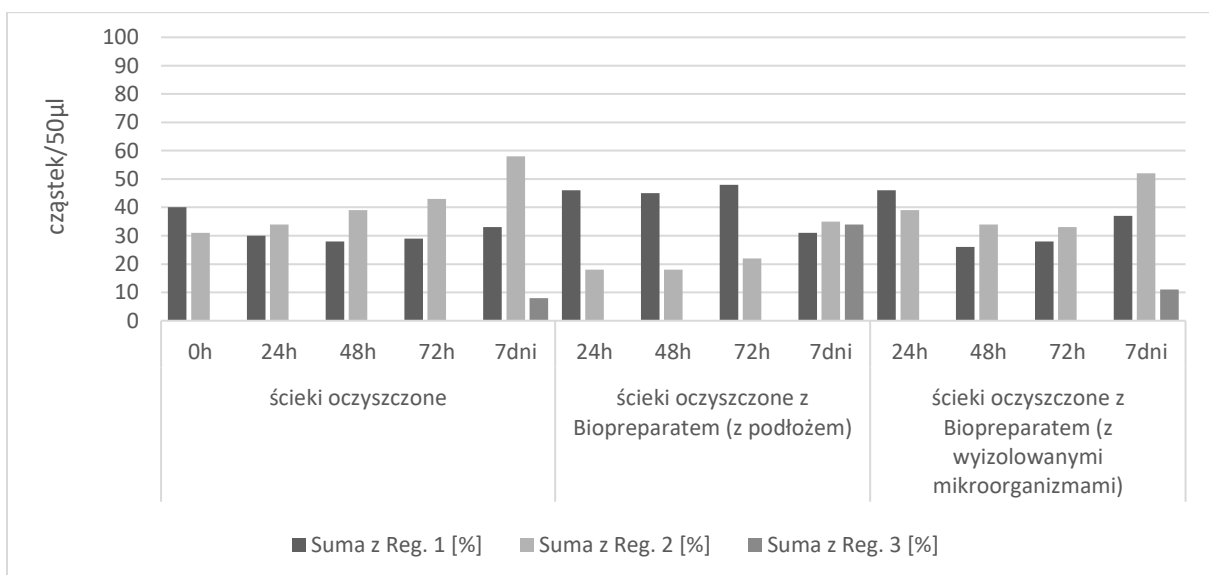
c) ATP ogólne, temp. 28°C

Wykres 18 a-c. Zmiany wartości RLU w badaniu wpływu podłoża, na którym namnażają się mikroorganizmy z biopreparatu A7, ma wpływ na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* ze ścieków oczyszczonych dla temp. 4,15 i 28°C; załącznik 20

W analizie cytometrycznej FCM dla prób inkubowanych w temperaturze 4°C (wykres 19a-b) zaobserwowano porównywalne wielkości populacji martwych (reg. 1) i żywych (reg. 2) w ściekach oczyszczonych. Ścieki oczyszczone z dodatkiem biopreparatu, w przeciwieństwie do prób z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami, charakteryzowały się większą liczbą populacji bakteryjnych z niską fluorescencją, czyli komórek martwych. Dodatkowo odnotowano wpływ czasu na stopień uszkodzenia komórek, ponieważ każdorazowo, bez względu na rodzaj analizowanej próby, 7 dnia badania zauważono wydzielenie się trzeciej populacji bakteryjnej (reg. 3).

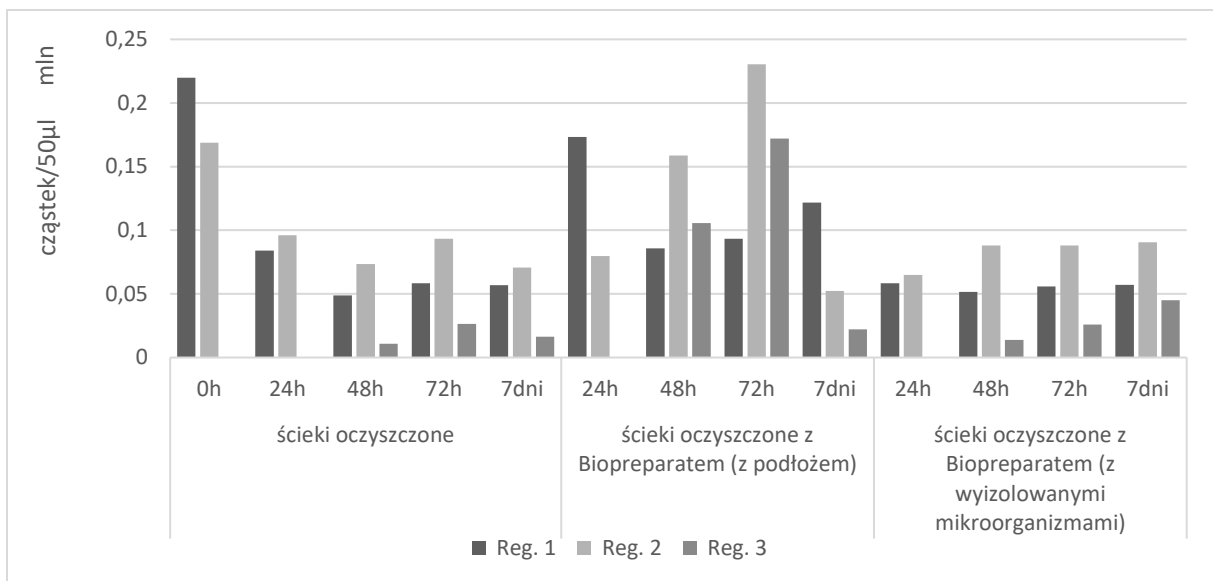


a) Analiza FCM

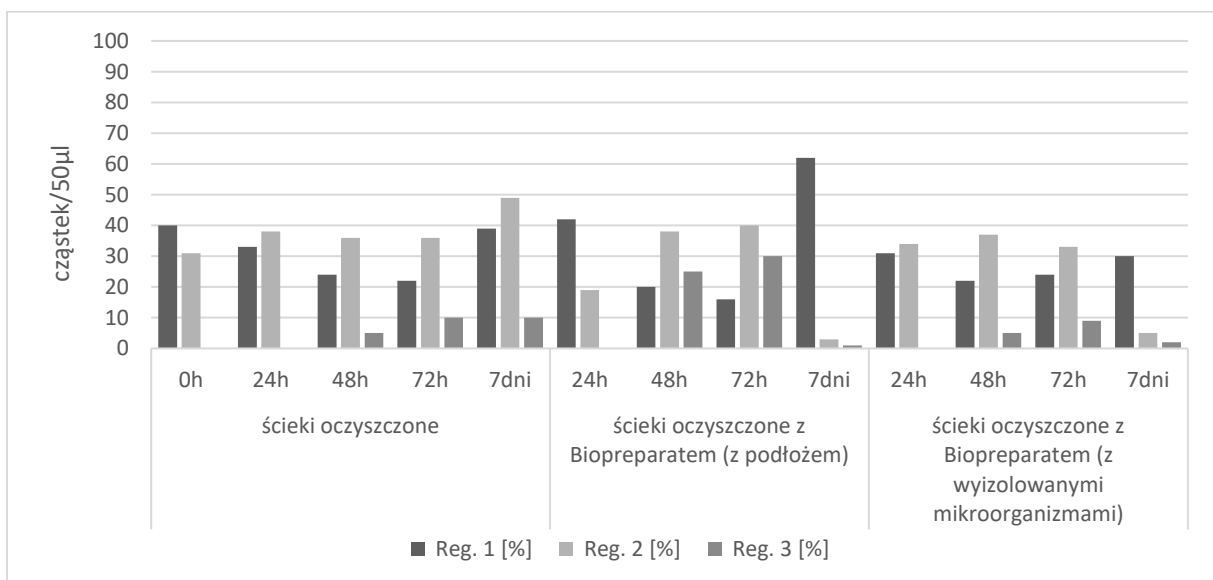


b) Udział procentowy [%]

Wykres 19 a-b. Analiza FCM. Wpływ podłoża, na którym namnażają się mikroorganizmy, na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* ze ścieków oczyszczonych; inkubacja prób w temp. 4 °C; załącznik 21



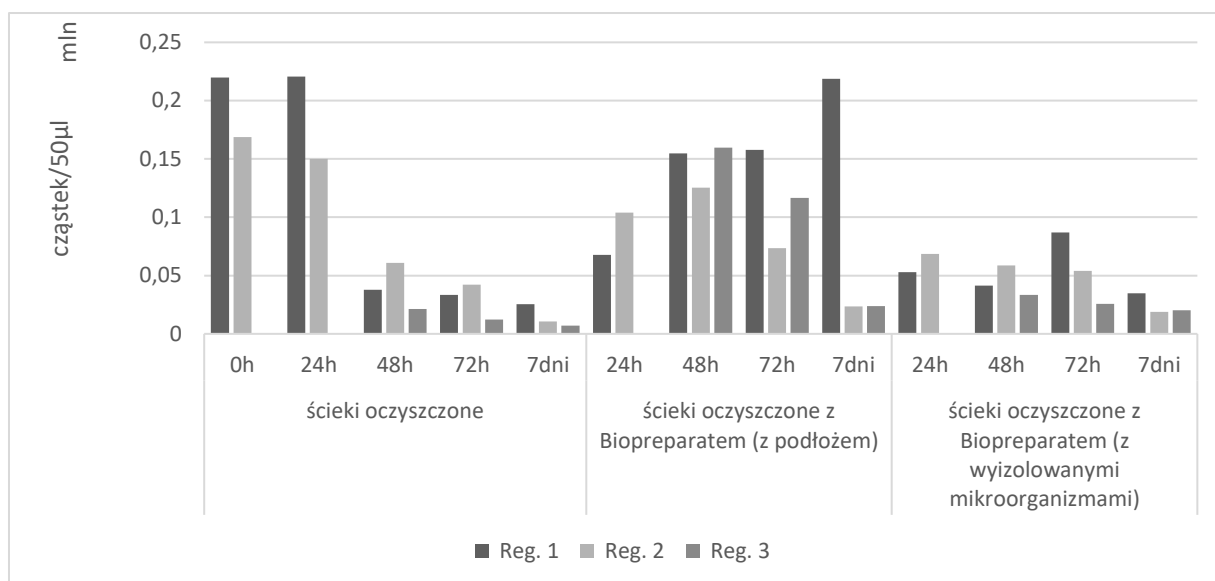
a) Analiza FCM



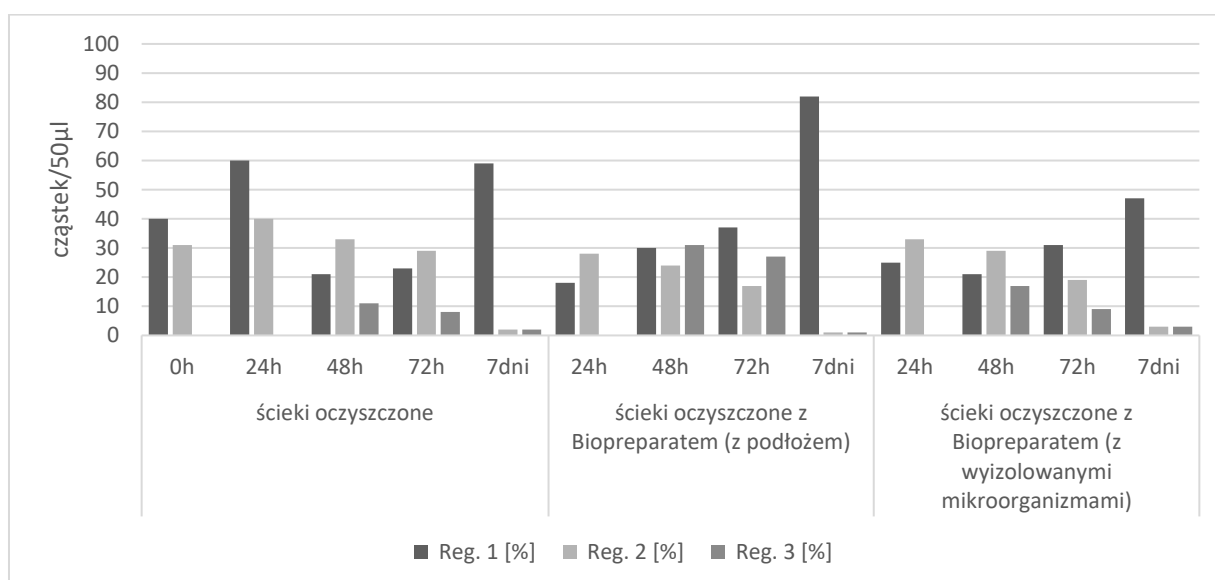
b) Udział procentowy [%]

Wykres 20 a-b. Analiza FCM. Wpływ podłoża, na którym namnażają się mikroorganizmy od biopreparatu, ma wpływ na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* ze ścieków oczyszczonych dla temp. 15°C; załącznik 21

Wzrost temperatury do 15°C (wykres 20a-b) spowodował przyspieszenie rozdziału populacji bakteryjnych względem fluorescencji – wydzielenie regionu 3 następowało już w 48h eksperymentu. Analogicznie sytuacja wygląda na wykresie 21a-b – dalsze podnoszenie temperatury (do 28°C) nie spowodowało przyspieszenia rozdziału komórek bakteryjnych na trzy populacje.



a) Analiza FCM



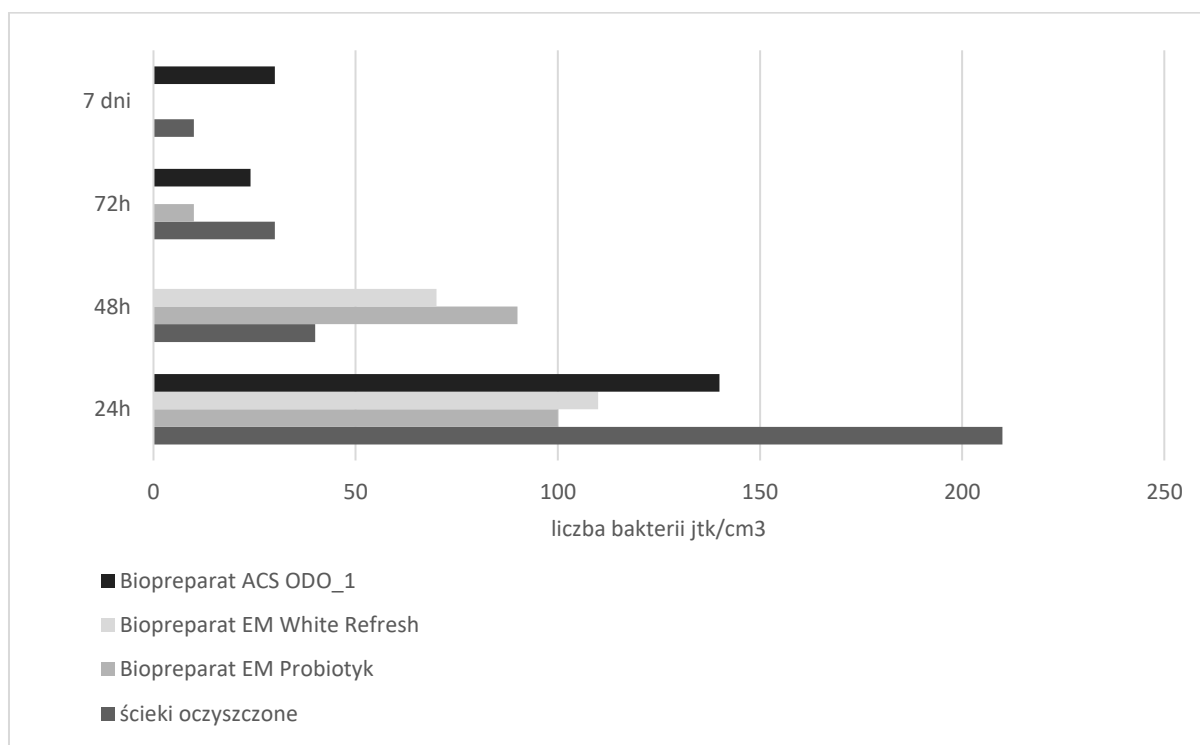
b) udział procentowy [%]

Wykres 21 a-b. Wpływ podłoża, na którym namnażają się mikroorganizmy od biopreparatu A7, ma wpływ na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* ze ścieków oczyszczonych dla temp. 28°C; załącznik 21

3.2.7. Wyniki badań liczebności paciorkowców kałowych

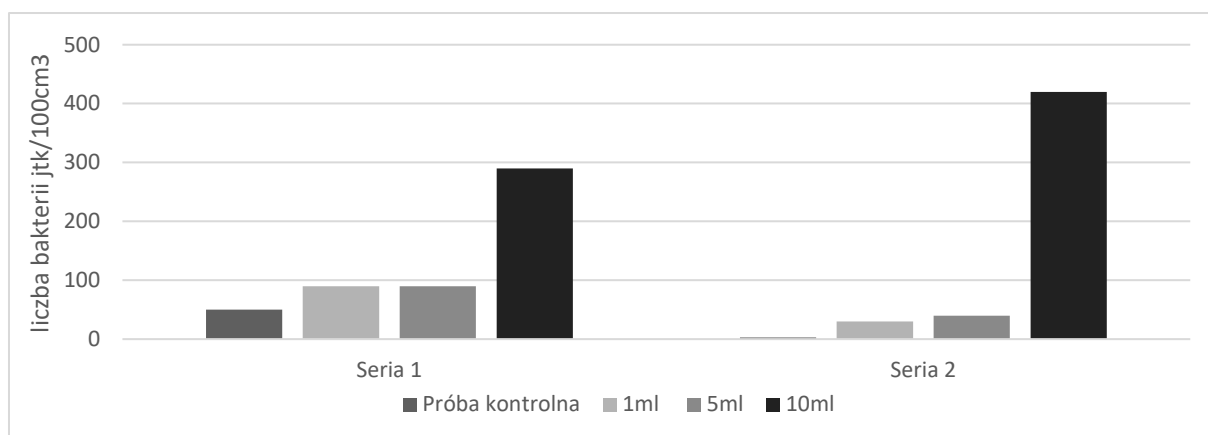
Liczebność paciorkowców kałowych w ściekach oczyszczonych wynosiła 2×10^3 jtk/100cm³. Po 24h od dodania do ścieków biopreparatów ich liczba zmniejszyła się: od 1×10^2 do $1,4 \times 10^2$ jtk/100cm³ w zależności od biopreparatu. W kolejnych dniach trwania eksperymentu wartości te ulegały dalszemu obniżeniu: w 72h liczebność paciorkowców kałowych wynosiła kolejno: 3×10^1 jtk/100cm³ dla ścieków oczyszczonych, $2,4 \times 10^1$ jtk/cm³ dla biopreparatu ACS ODO_1, 1×10^1 jtk/100cm³ dla biopreparatu EM Probiotyk oraz 0 jtk/100cm³

dla biopreparatu EM White Refresh. Najlepszy rezultat uzyskano w próbie z zastosowaniem EM White Refresh, w dawce 5 cm³ biopreparatu/dm³ ścieków, ponieważ wartość 0 jtk/cm³ utrzymała się do 7 dnia trwania eksperymentu. Najgorszy wynik, świadczący o właściwościach stymulujących rozwój paciorkowców kałowych, wykazał biopreparat ACS ODO_1 – ich wysoka liczebność utrzymała się do końca eksperymentu, przy czym 7 dnia przewyższała liczbę paciorkowców w próbie kontrolnej (wykres 22).



Wykres 22. Liczba paciorkowców kałowych w próbach z: EM Probiotyk, EM White Refresh i ACS ODO_1 oraz w próbie kontrolnej; załącznik 22

W przypadku próby kontrolnej po początkowej obecności w niej paciorkowców kałowych po upływie 7 dni badania zauważono nieobecność tych mikroorganizmów. Natomiast próby, w których zastosowano dawki Bio-Trakt Plus wykazywały wzrostową tendencję liczebności paciorkowców kałowych. Najwyższe wartości uzyskano dla dawki 10cm³ biopreparatu/dm³ ścieków (wykres 23).



Wykres 23. Liczba paciorkowców kałowych w próbach z zastosowaniem biopreparatu Bio-Trakt Plus oraz w próbie kontrolnej; załącznik 23

3.2.8. Analizy molekularne PCR

Analiza PCR pozwoliła na określenie ponad 60 różnych rodzajów bakterii bytujących w ściekach oczyszczonych (tabela 14 oraz załączniki 24a-c).

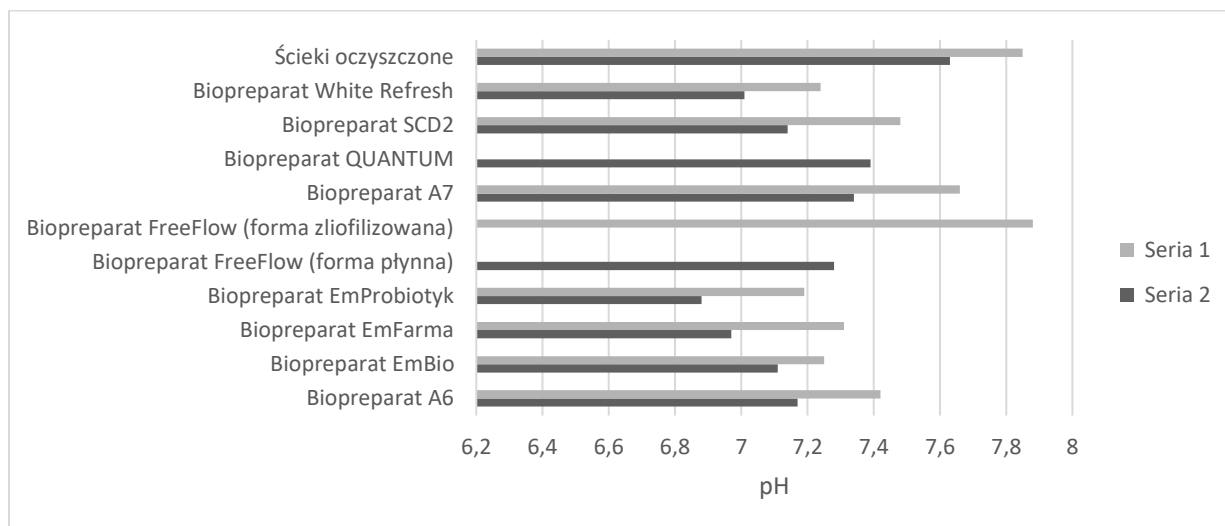
Tabela 14. Wyniki badań metodą PCR na obecność bakterii z grupy *coli* w ściekach oczyszczonych z dodatkiem biopreparatów; załącznik 24a-c

Biopreparat	Obecność bakterii <i>coli</i>	<i>Proteobacteria</i> <i>Grammaproteobacteria</i> <i>Enterobacteriales</i> <i>Enterobacteriaceae</i> – <i>Genus</i>	Procentowy udział bakterii <i>coli</i> w próbach po 5 dniach działania biopreparatu
A6	brak	-	-
ACS ODO_1	obecne	<i>Unclassified</i> <i>Raoultella</i> <i>Citrobacter</i> <i>Klebsiella</i>	2,4858%
SCD2	obecne	<i>Unclassified</i> <i>Citrobacter</i> <i>Phytobacter</i> <i>Klebsiella</i>	0,4519%
EM Probiotyk	obecne	<i>unclassified</i>	0,2410%
ACS AQUA 8T	obecne	<i>unclassified</i>	0,1074%

W składzie czterech z pięciu przebadanych prób (ścieków oczyszczonych z dodatkiem biopreparatów) bakterie z grupy *coli* były obecne w różnym składzie procentowym (od 0,1074% do 2,4858%) nawet po 5 dniach działania biopreparatu, co świadczy o tym, że przebadane biopreparaty nie wykazały działania higienizacyjnego. Tylko próba ścieków z dodatkiem biopreparatu A6 wykazała brak obecności bakterii *coli* (tabela 14, załącznik 24).

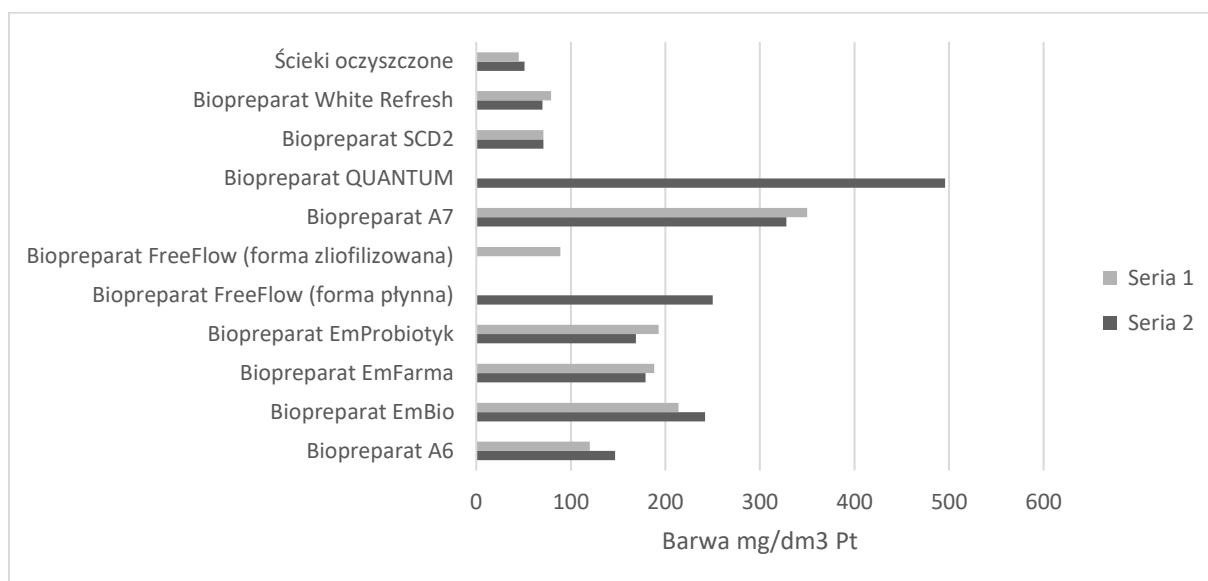
3.2.9. Wyniki zmian parametrów fizykochemicznych

Dodanie biopreparatu do próby każdorazowo powodowało lekkie obniżenie wartości pH, jednak odnotowane różnice nie mogą zostać uznane za istotne (wykres 24).



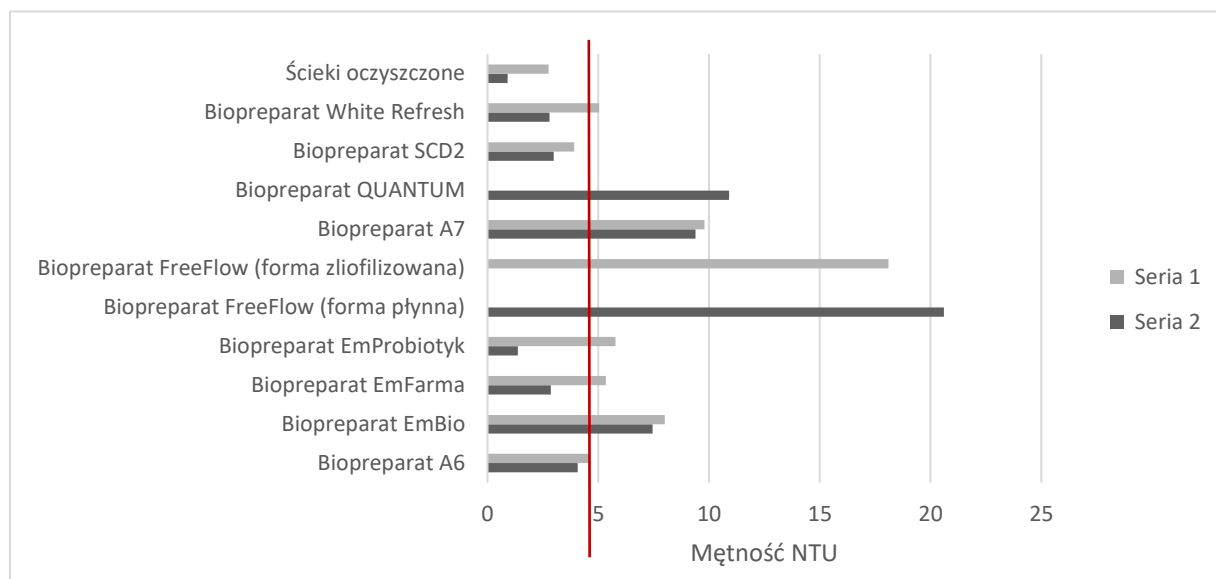
Wykres 24. Wpływ biopreparatów na pH próby; załącznik 25

Dodanie biopreparatów do ścieków oczyszczonych spowodowało dość istotną zmianę ich barwy. Wszystkie biopreparaty pogorszyły barwę ścieków. Najgorszy wynik uzyskano dla biopreparatu QUANTUM, ponieważ wpłynął on na zmianę barwy, pogarszając ją 10-krotnie: z około 50 mg/dm^3 w ściekach oczyszczonych do niemal 500 mg/dm^3 Pt po dodaniu biopreparatu QUANTUM (wykres 25).



Wykres 25. Wpływ biopreparatów na barwę próby; załącznik 25

Podobnie jak w przypadku barwy, biopreparaty spowodowały dość istotną zmianę mętności ścieków. Z wyjątkiem biopreparatu SCD2 wszystkie biopreparaty wykorzystane w eksperymencie doprowadziły do pogorszenia parametru mętności i przekroczenia wartości 5 NTU przynajmniej w jednej serii badawczej (wykres 26).



Wykres 26. Wpływ biopreparatów na mętność próby; załącznik 25

Przeprowadzone analizy zawiesiny ogólnej wykazały wzrost ilości zawiesiny mieszczącej się w granicy błędu oznaczalności, w związku z tym uznano, że biopreparaty nie wpływają na zwiększenie ilości zawiesiny ogólnej w badanych próbach.

3.2.10. Dyskusja

Biopreparaty to środki biologiczne, które stymulują naturalne procesy biodegradacji substancji organicznych i przemian związków nieorganicznych zawartych w ściekach. Konsekwencją ich działania jest wspomaganie procesu oczyszczania ścieków. Większość biopreparatów wykorzystywanych w procesach oczyszczania ścieków usuwa przykre i nieprzyjemne zapachy, zmniejsza zarastanie i zamulanie przewodów, poprawia wydajność systemów biologicznego i mechanicznego oczyszczania ścieków. Środki te są stosowane w instalacjach i urządzeniach kanalizacyjnych takich jak: osadniki gnilne, zbiorniki bezodpływowe, zbiorniki odtłuszczające, studzienki zbiorcze, osadniki, stawy czy laguny osadowe [393]. Higienizacyjny wpływ biopreparatów EM wykazano w pracy M. Maha i in.[15] dotyczącej badania skuteczności działania mikroorganizmów EM na poprawę jakości ścieków w Egipcie. Badania prowadzono na ściekach, w których liczebność bakterii *coli* wynosiła

$1,3 \times 10^6$ jtk/100cm³ i $2,1 \times 10^5$ jtk/100cm³. Po 20 dniach działania biopreparatu redukcja liczebności bakterii *coli* wynosiła odpowiednio 99,9% i 99,8% [394]. Przeprowadzone w niniejszej pracy badania, z uwagi na ich praktyczny aspekt, realizowane były w okresie do 7 dni. Wydłużenie czasu ich trwania miałoby uzasadnienie jedynie w przypadku badań dotyczących możliwości wykorzystania biopreparatów w poprawie jakości ścieków gromadzonych w szczelnych zbiornikach bezodpływowych (typu szambo). W warunkach ciągłego przepływu ścieków, jakie panują na komunalnych oczyszczalniach ścieków, wydłużenie czasu trwania badań laboratoryjnych nie miało podstaw.

Literatura podaje, że podstawą stosowania biopreparatów w procesach oczyszczania ścieków jest zawartość w ich składzie metabolitów bakterii [395,204,396,208]. Wykazano, że wiele drobnoustrojów produkuje substancje wpływające antagonistycznie na wzrost i rozwój bakterii (oddziałują na organizmy konkurencyjne, osłabiając je lub niszcząc). Do wspomnianych metabolitów bakterii kwasu mlekowego (główny składnik wielu biopreparatów) należy zaliczyć m.in.: kwasy organiczne (mlekowy i octowy), metabolity niskocząsteczkowe (diacetyl, aldehyd octowy, kwasy tłuszczowe, etanol), bakteriocyny (białka toksyczne dla bakterii), enzymy bakteryjne (lizozymy) i inne (woda utleniona). Im szersze spektrum aktywności wspomnianych metabolitów, tym większe szanse na przeżycie i zdominowanie zasiedlanego środowiska mają wytwarzające je drobnoustroje. Jednym z ciekawszych metabolitów komórkowych o silnej aktywności antybakteryjnej są bakteriocydy (substancje białkowe o masie cząsteczkowej od kilku do kilkudziesięciu kDa, produkowane przez wiele grup bakterii). Większość bakteriocyn charakteryzuje się wąskim spektrum aktywności i działa jedynie na bakterie blisko spokrewnione z wytwarzającymi je organizmami, tzw. producentami (zdolność produkcji bakteriocyn jest zwykle cechą szczepową) [208]. Co ciekawe, niektóre bakteriocyny są zdolne do oddziaływania na bakterie niespokrewnione ze swymi producentami [207].

Biopreparaty są powszechnie używane w procesach oczyszczania ścieków. Według Higi i Chinena [202] podstawą stosowania technologii EM w procesach oczyszczania ścieków jest fakt, że zawierają one omówione powyżej bakterie kwasu mlekowego. Tworzenie przeciwutleniaczy przez EM pomaga w poprawie separacji ciała stałego od cieczy, co jest podstawą oczyszczania wody [202,397]. W działaniu biopreparatów kluczową rolę odgrywają enzymy, a dopiero w następnej kolejności bakterie. Enzymy są związkami białkowymi działającymi jak katalizatory reakcji biologicznych. W odróżnieniu od katalizatorów chemicznych odznaczają się wysoką selektywnością działania, czasami dany enzym może katalizować tylko jedną reakcję tylko jednego związku, zwanego substratem enzymu. Tak jak wszystkie katalizatory, enzymy nie zmieniają stałej równowagi reakcji i nie powodują przemian

chemicznych, a jedynie obniżają energię aktywacji reakcji, przyspieszając ją. W skład preparatów mikrobiologicznych przeznaczonych do oczyszczania ścieków najczęściej wchodzi bakterie z rodziny *Pseudomonas* lub *Bacillus*. W środowisku naturalnym (w wodzie i glebie) biorą one czynny udział w procesach samooczyszczania. W biopreparatach ich koncentracja jest bardzo duża, najczęściej 1 g kultur bakteryjnych zawiera 10^4 – 10^9 bakterii.

W literaturze można odnaleźć informacje dotyczące higienizacyjnego działania biopreparatów. Pozytywny efekt osiągnięto w badaniach wpływu EM na tempo inaktywacji bakterii wskaźnikowych *Salmonella Senftenberg* W775 w gnojowicy pochodzącej z fermy trzody chlewnej. Teoretyczny czas przeżycia bakterii testowych *Salmonella Senftenberg* W775 wynosił dla próby z zastosowaniem preparatu EM 53 dni, a dla próby bez biopreparatu 67 dni. Zastosowanie Efektywnych Mikroorganizmów w praktyce, jako dodatku do płynnych odchodów zwierzęcych w celu eliminacji drobnoustrojów chorobotwórczych, stwarza alternatywę dla tradycyjnych metod unieszkodliwiania bakterii patogennych [398]. Także badania prowadzone przez Wrońskiego i in. [399] wykazały, że wprowadzenie preparatu EM do gnojowicy przyczyniło się do zwiększenia tempa eliminacji pałeczek *Salmonella Senftenberg* W775. Stwierdzony na podstawie analizy statystycznej teoretyczny czas przeżycia bakterii wskaźnikowych w próbie gnojowicy zawierającej preparat EM był znacznie krótszy niż w próbie bez jego udziału. Tempo eliminacji testowanych bakterii wynosiło w próbie z wykorzystaniem preparatu EM 0,15 log/dzień, zaś w próbie bez preparatu EM przyjęło wartość 0,12 log/dzień. Z rezultatów doświadczenia wynika, że istnieje możliwość zastosowania EM w praktyce, jako dodatku do gnojowicy poprawiającego efekty jej higienizacji.

Najczęściej biopreparaty zawierają w swoim składzie mieszaninę bakterii, substancje pokarmowe, nośnik i ewentualnie enzymy. W skład użytych w badaniach biopreparatów wchodziły przede wszystkim: bakterie kwasu mlekowego (*Lactic Acid Bacteria*) [400], z uwagi na produkcję aktywnych antagonistycznych metabolitów, bakterie saprofityczne [401], bakterie fotosyntetyzujące [401], drożdże [402,403,404], promieniowce (*Actinomycetes*) [405,406,407] oraz inne, w śladowych ilościach. Wszystkie te mikroorganizmy wykazują zdolność do przeprowadzania różnych procesów metabolicznych, które są kluczowe dla oczyszczania ścieków, takich jak rozkład związków organicznych czy usuwanie azotu i fosforu. Ponadto biopreparaty zostały dobrane tak, aby w swoim składzie zawierały bakterie zdolne do produkcji bakteriocyn, jak np. *Bacillus*, *Pseudomonas* czy *Lactobacillus*.

Biopreparaty zostały podzielone m.in. z uwagi na ich formę. Badacz Kasza [408] wskazuje, że szczepy zawarte w biopreparatach mogą być przechowywane w formie liofilizatów (np. użyty w badaniach biopreparat FreeFlow), zamrażane lub umieszczane w specjalnej zawieszynie

(w formie płynnej – większość biopreparatów wykorzystana w eksperymencie). Wyniki analizy ATP w niniejszej pracy wykazały, że wartość RLU była wyższa w próbach z biopreparatem w formie zliofilizowanej niż w próbach z biopreparatem w formie płynnej. Może to wynikać m.in. z koncentracji mikroorganizmów (liofilizacja może prowadzić do większej koncentracji mikroorganizmów na jednostkę objętości, co przekłada się na wzrost stężenia ATP i tym samym wartości RLU) oraz ich aktywności metabolicznej (mikroorganizmy w formie zliofilizowanej mogą wykazywać wyższą aktywność metaboliczną w porównaniu do formy płynnej, co prowadzi do większej produkcji ATP [409]. Podobną zależność zaobserwowano w badaniach nad wpływem dodatkowego natleniania. Analiza stężenia ATP wykazała, że zastosowanie biopreparatu ACS ODO_1 bez dodatkowego natlenienia powoduje zdecydowanie lepszy wzrost mikroflory niż w przypadku prób dodatkowo natlenianych. Jest to spowodowane faktem, że bakterie kwasu mlekowego – główny składnik biopreparatu – rozwijają się lepiej w warunkach ograniczonego dostępu tlenu.

Jak zauważają Sapięha-Waszkiewicz i in. [410] biopreparaty mogą mieć w swoim składzie różnego rodzaju podłoża, jak wyciągi z roślin. Jako przykład tego typu biopreparatu w pracy wykorzystano biopreparat Em White Refresh, składający się m.in. z koncentratu owocowego. Przebadano również biopreparaty z podłożem z ekstraktu z otrąb ryżowych oraz ekstraktów ziołowych. Podstawowym rodzajem podłoża, na którym namnażają się mikroorganizmy jest jednak melasa z trzciny cukrowej. Głównie z tego powodu w badaniach wykorzystano największą liczbę biopreparatów z tego rodzaju podłożem. Należy pamiętać, że zawartość melasy w danym biopreparacie może się znacząco różnić i zależeć od indywidualnego składu przygotowanego przez producenta (w zależności od konkretnego produktu i jego zastosowania), co może wpływać na skuteczność działania biopreparatów m.in. w redukcji liczebności bakterii *coli*.

W badaniach uwzględniono zarówno rodzaj, jak i wpływ samego podłoża (wyizolowanie mikroorganizmów od podłoża, na którym się namnażają) na skuteczność działania biopreparatów. Laktoza jest ważnym składnikiem w detekcji bakterii *coli*, ponieważ ich oznaczenie opiera się przede wszystkim na jej rozkładzie. *Coli* są grupą bakterii fermentujących laktozę, które najprawdopodobniej nabyły gen *lacZ* poprzez poziomy transfer genów i dlatego stanowią grupę polifiletyczną [411]. Wśród tej grupy bakterii znajduje się również *Escherichia coli*. Badania wykazały, że zawartość laktozy może wpływać na wyniki oznaczenia bakterii *coli*. Na przykład w jednym z badań [412] wykazano, że próbka laktozy pokazuje wzrost indukcji w porównaniu z kontrolą gliceryny z 79% wzrostem β -galaktozydazy przez 44 minuty wzrostu [412]. Innymi słowy, obecność laktozy może zwiększyć aktywność β -galaktozydazy,

co z kolei może wpływać na wyniki oznaczenia bakterii *coli*. W związku z tym zawartość laktozy w biopreparatach może rzutować na wyniki oznaczenia bakterii *coli*, ponieważ oznaczenie tych bakterii opiera się w głównej mierze na rozkładzie laktozy. Dlatego ważne jest, aby uwzględnić zawartość laktozy podczas interpretacji wyników oznaczenia bakterii *coli* lub spróbować odseparować mikroorganizmy zawarte w biopreparatach od podłoża (laktozy). Filtracja membranowa może być jednym ze sposobów stosowanych do oddzielenia mikroorganizmów od podłoża, na którym się namnażają (laktozy), może też być wykorzystywana w celu zwiększenia skuteczności działania biopreparatów w eliminacji bakterii z grupy *coli* [413].

Dla wybranych serii oznaczano liczebność paciorkowców kałowych, które należą do grupy bakterii charakteryzujących się długą przeżywalnością w wodzie, przez co są zalecane jest przez wielu badaczy jako dobry wskaźnik jakości mikrobiologicznej wody [414]. Dodatkowym argumentem przemawiającym za uwzględnieniem liczebności paciorkowców kałowych był fakt, że oznaczanie tego wskaźnika w wodach powierzchniowych wykorzystywanych do kąpieli jest obowiązkowe w krajach Unii Europejskiej [415,100]. Wykazano korzystny wpływ na zahamowanie rozmnażania paciorkowców kałowych w próbach z zaaplikowanymi biopreparatami.

W badaniach uwzględniono ponadto wpływ biopreparatów na pH, zawiesinę barwę i mętność w ściekach oczyszczonych. Biopreparaty spowodowały dość istotną zmianę mętności ścieków. Jest to o tyle istotne, że zgodnie z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2020/741 z dnia 25 maja 2020 r. w sprawie minimalnych wymogów dotyczących ponownego wykorzystania wody (wykres 26) ścieki z dodatkiem biopreparatów nie spełnią wymogów dotyczących jakości odzyskanej wody do nawadniania w rolnictwie dla klasy A.

W badaniach przeprowadzonych przez S. Bonetta i in.[416], dotyczących dezynfekcji ścieków komunalnych, wyniki analiz PCR wykazały, że 50% (3/6) ścieków oczyszczonych z oczyszczalni WWTP1 i OŚ3 było pozytywnych pod względem obecności *E. coli* O157:H7. Ustalenia te korelują z wynikami analizy PCR zleconej na potrzeby prowadzonych w pracy badań. W składzie czterech z pięciu przebadanych prób (ścieków oczyszczonych z dodatkiem biopreparatów) wykryto bakterie z grupy *coli*, czym potwierdzono ich obecność w ściekach oczyszczonych odprowadzanych z oczyszczalni. Tylko w próbie z biopreparatem A6 analizy PCR nie potwierdziły obecności bakterii *coli*. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że na innym etapie eksperymentu oznaczenia liczebności bakterii *coli* wykonane tradycyjnymi metodami hodowlanymi wykazały znaczną liczbę bakterii *coli* w próbach z dodatkiem biopreparatu A6 (sięgające nawet $9,3 \times 10^3$ jtk/100cm³).

Rozbieżność między wynikami analizy PCR a tradycyjnymi metodami hodowlanymi może wynikać z kilku czynników:

- metody hodowlane wykrywają żywe, zdolne do wzrostu bakterie, podczas gdy metody PCR mogą wykrywać DNA bakterii niezależnie od tego, czy są one żywe, czy nie; jeśli bakterie *coli* były obecne, ale nie były żywe lub zdolne do wzrostu, mogły być wykryte przez test PCR, ale nie przez metodę hodowlaną. To oznacza, że metoda hodowlana może nie wykryć bakterii, które nie są już żywe lub zdolne do wzrostu, podczas gdy test PCR może wykryć DNA tych bakterii, nawet jeśli nie są już żywe;
- w próbkach mogą występować inhibitory PCR, które mogą wpływać na wyniki testów PCR, prowadząc do fałszywie negatywnych wyników; mogą one pochodzić z próbki lub mogą być wprowadzone podczas procesu ekstrakcji DNA;
- agar *Chromocult Coliform*, wykorzystany w eksperymencie, zawiera substraty chromogenne, umożliwiające różnicowanie bakterii *coli* i *E. coli* (rozróżnienie za pomocą barwy); jednakże nie jest to metoda w stu procentach specyficzna przez co mogą na niej rosnać również inne mikroorganizmy, np. niektóre bakterie, które są również fermentatorami laktozy, mogą rosnać na agarze i być mylnie identyfikowane jako bakterie *coli*. W badaniach przeprowadzonych przez Finney i in. [417] 11,25% kolonii bakterii *coli* i 8,75% szczepów bakterii *E. coli*, okazała się być albo fałszywie dodatnia pod względem aktywności h-glukuronidazy, albo fałszywie ujemna pod względem aktywności h-galaktozydazy na agarze *Chromocult*. Dwa szczepy inne niż *E. coli* (*Citrobacter spp.* i *Enterobacter spp.*) wykazywały produkcję h-glukuronidazy i pojawiały się jako fioletowo-niebieskie kolonie na agarze *Chromocult*. Inni autorzy wskazani w pracy Finney (Pe´rez i in.[418], Sarhan i Foster [419], Gauthier i in.[420], Alonso i in.[421,422], Geissler i in.[423] również potwierdzali powyższe obserwacje.

Określenie skuteczności działania biopreparatów w poprawie jakości mikrobiologicznej ścieków oczyszczonych nie przyniosło zakładanych efektów. Zastosowane w badaniach biopreparaty wykazały działanie stymulujące rozwój lub odbudowę bakterii *coli* w ściekach oczyszczonych. Uzyskane pozytywne wyniki, z uwagi na niedoskonałość metod hodowlanych (np. problem wyników fałszywie dodatnich), w dalszym ciągu wydają się dyskusyjne. Jedną z tez sformułowanych w niniejszej rozprawie było twierdzenie, że możliwy jest wzrost potencjału ponownego wykorzystania ścieków poprzez wykorzystanie m.in. metod

biologicznych – biopreparatów. Tezę tę postawiono z uwagi na dotychczasowe szerokie doświadczenie w stosowaniu biopreparatów w oczyszczaniu ścieków i rewitalizacji wód. Przykładowo, jak wskazują zalecenia producenta, biopreparat Bio-Trakt Plus służy m.in. do rewitalizacji wody odpływowej z oczyszczalni ścieków oraz „skutecznego usuwania bakterii chorobotwórczych, patogenów i pasożytów ze ścieków i osadów pościekowych. (...) Szczególnie przydatnym okazał się (...) w przydomowych oczyszczalniach ścieków oraz szambach. Odzyskaną ze ścieków wodę (ponad 90 % objętości zrzucanych ścieków) można powtórnie wykorzystania do podlewania trawników, drzewek, krzewów i upraw warzywnych”. Zgodnie z zaleceniami producenta biopreparat „dawkuje się w ilości 1 dm³/m³ ścieków, znajdujących się w szambie lub komorze ściekowej, uzupełniając 2 x w tygodniu” [370].

Biopreparat Bio-Trakt Plus był z sukcesem stosowany w badaniach E. Fiałkowskiej i in.[424] jako preparat służący do karmienia wrotków w osadzie czynnym. Celem wspomnianych badań było wykorzystanie naturalnie występujących w osadzie czynnym mikroorganizmów – wrotek (*Lecane inermis*) – które, kontrolując nadmierny przyrost bakterii nitkowatych, zmniejszałyby ilość produktywnego osadu nadmiernego oraz ograniczają zjawisko puchnięcia i pienienia się osadu czynnego [425]. W badaniach przeprowadzonych przez A. Walczyńską i M. Sobczyk [426,427] badano wpływ temperatury i niedotlenienia na wrotki *Lecane inermis*. Zastosowano dawkę 10µl biopreparatu Bio-Trakt Plus rozcieńczonego 1:10/1 ml wody, co w przeliczeniu daje 10cm³ biopreparatu/1dm³ wody. W próbach z użyciem tego biopreparatu zaobserwowano, że wysoka dawka biopreparatu (10cm³/1dm³) była w stanie zahamować rozwój bakterii *E. coli* – Bio-Trakt Plus jako jedyny spowodował ograniczenie rozmnażania się bakterii *Escherichia coli* i utrzymał ten efekt na czas trwania eksperymentu. W innej serii badań udowodniono jednak, że próby, w których zastosowano biopreparat Bio-Trakt Plus, wykazały wzrostową tendencję liczebności paciorkowców kałowych w zależności od dawki – biopreparat wykazał najwyższe efekty stymulujące wzrost ich liczebności. Najgorsze wyniki uzyskano dla zalecanej przed producenta dawki 1cm³/1dm³. W dalszych badaniach zdecydowano się na zastosowanie dawki 5cm³ biopreparatu na 1dm³ ścieków oczyszczonych. Na podstawie danych ujętych w tabeli w załączniku 4 zaobserwowano, że dawka 5 cm³ przyczyniła się do redukcji liczebności bakterii *coli* w niewiele mniejszym stopniu niż dawka 10 cm³. Co więcej, dawka 5 cm³ jest bardziej efektywna pod względem ekonomicznym, co ma istotne znaczenie w praktycznym wykorzystaniu biopreparatów w ciągu technologicznym.

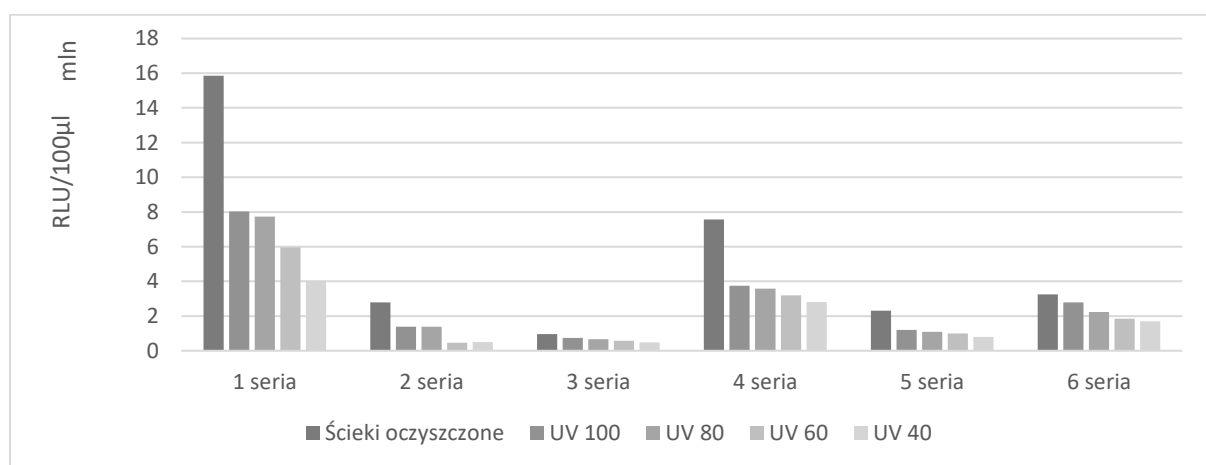
Korzystny wpływ na zahamowanie rozmnażania paciorkowców kałowych wykazały biopreparaty EM Probiotyk, EM White Refresh i ACS ODO_1. W kontekście redukcji bakterii *coli* nie odnotowano już jednak tak pozytywnych wyników. W badaniach użyto biopreparatu ACS ODO_1, ponieważ od lat jest z powodzeniem stosowany w procesach rewitalizacji wód. Wykorzystany został m.in. w zbiorniku zaporowym Pasternik w Starachowicach. Wprowadzone konsorcja mikroorganizmów zintensyfikowały procesy biodegradacji związków organicznych w osadach dennych i wodzie powierzchniowej zbiornika. Jak zauważa R. Mazur wraz z zespołem [373]: „zaaplikowano biopreparaty kierunkowe w celu przyspieszenia procesów biodegradacji zanieczyszczeń organicznych w wodach zbiornika zaporowego. Odnotowano znaczące zmniejszenie osadów dennych (miękkich frakcji organicznych) w obszarze, gdzie nie stosowano metod mechanicznych. Wprowadzenie mikrobiologicznych preparatów znacząco złagodziło zaburzenia wynikające z inwazyjnej ingerencji metod mechanicznych oraz poprawiło strefę eufotyczną wody i korzystnie wpłynęło na poprawę profilu tlenowego od wody przydennej do powierzchniowej”. Podsumowując, można stwierdzić, że biopreparaty wykazują korzystny wpływ na zbiorniki wodne, ale nie zawsze na jakość mikrobiologiczną wody.

3.3. Wykorzystanie promieniowania ultrafioletowego UV w dezynfekcji ścieków oczyszczonych

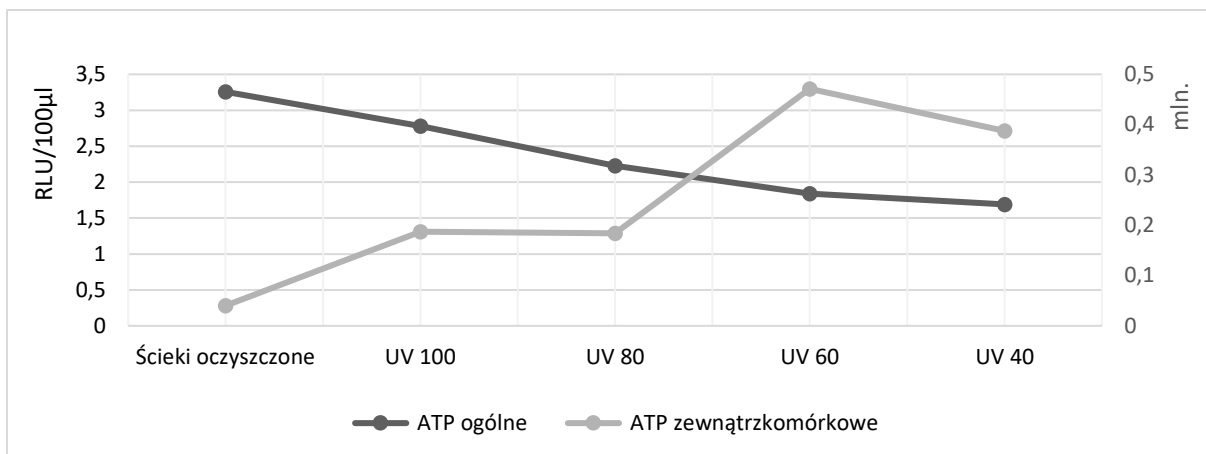
3.3.1. Określenie skuteczności zastosowanych dawek promieniowania

Po dezynfekcji promieniami UV w próbkach przy wszystkich zastosowanych prędkościach (UV40, UV60, UV80 i UV100) nie stwierdzono bakterii z grupy *coli* oraz *E. coli*. Dla pozostałych bakterii odnotowano znaczny spadek ich liczebności, wynoszący kolejno: max 1×10^1 jtk/100cm³ dla bakterii psychrofilnych, max $9,1 \times 10^2$ jtk/100cm³ dla bakterii mezofilnych oraz max $6,1 \times 10^1$ jtk/100cm³ dla bakterii przetrwalnikujących (załącznik 26).

Analizę ATP przeprowadzono bezpośrednio po procesie dezynfekcji. W ściekach oczyszczonych wartość ATP całkowitego/ogólnego była wysoka, natomiast ATP zewnątrzkomórkowego bardzo niska. Z kolei po dezynfekcji UV wartość zewnątrzkomórkowego ATP gwałtownie wzrosła, podczas gdy wartość całkowitego ATP spadała. Im mniejsze było natężenie przepływu (a co za tym idzie, dawka promieniowania UV była wyższa), tym bardziej wzrastała wartość zewnątrzkomórkowego ATP. Oznacza to, że proces dezynfekcji przebiegał prawidłowo (wykresy 27 i 28).

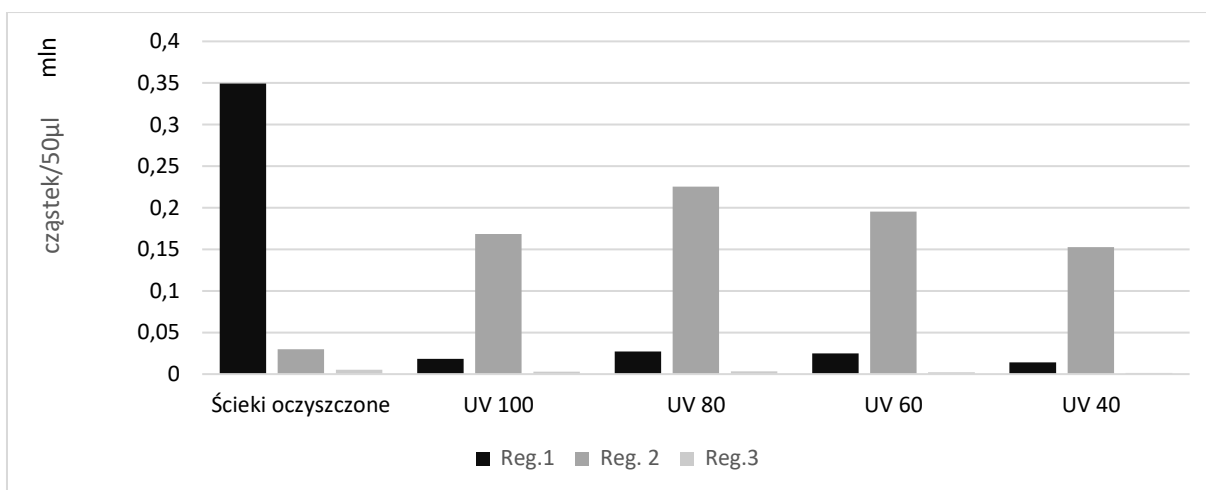


Wykres 27. Zmiany wartości RLU (ATP ogólnego) dla poszczególnych szybkości dezynfekcji UV w kolejnych seriach badań; załącznik 27

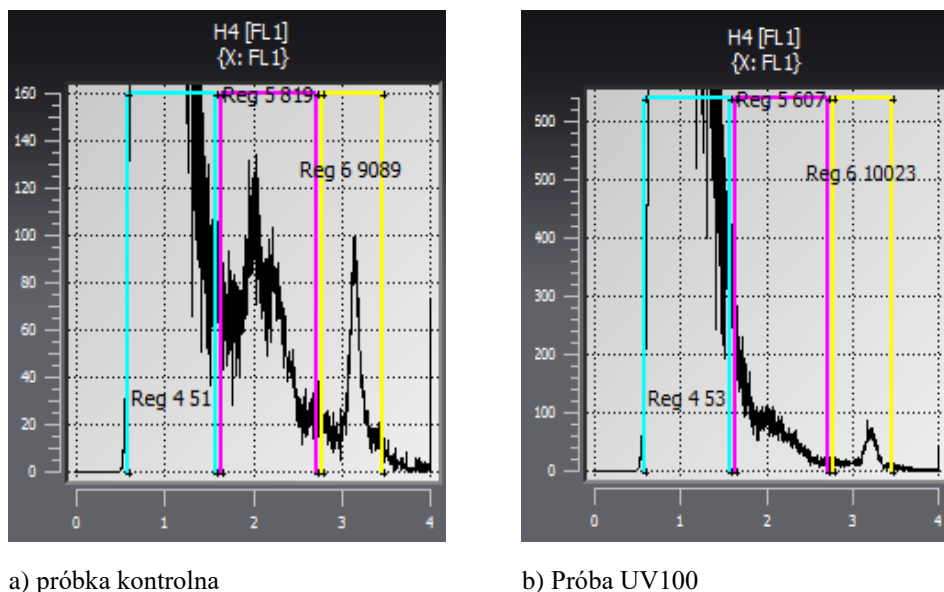


Wykres 28. Zależność pomiędzy całkowitym ATP i zewnątrzkomórkowym ATP dla poszczególnych szybkości dezynfekcji UV; załącznik 27

Na podstawie wyników analiz cytometrycznych potwierdzono skuteczność dezynfekcji UV. W próbach kontrolnych wydzielono dużą populację komórek żywych (HNA – reg.1) – 349 454/50µl i stosunkowo małą liczbę komórek martwych (LNA – reg.2) – 29 945/50µl. Po przejściu przez promiennik UV z różnym natężeniem przepływu liczba martwych bakterii znacznie wzrosła, natomiast liczba bakterii żywych spadła (wykres 29, rysunek 9a-b).



Wykres 29. Analiza FCM. Wpływ promieniowania UV na liczbę komórek martwych [LNA] reg.1 i uszkodzonych (reg.2) oraz komórek żywych [HNA] reg.3; załącznik 28

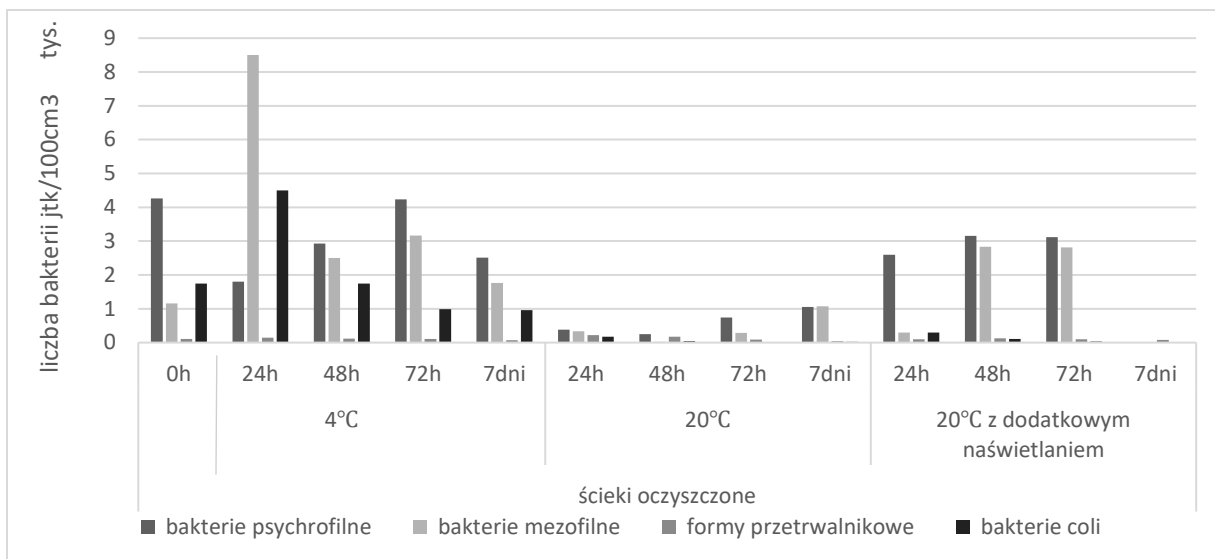


Rysunek 9 a-b. Analiza FCM. Wpływ promieniowania UV na liczbę żywych komórek

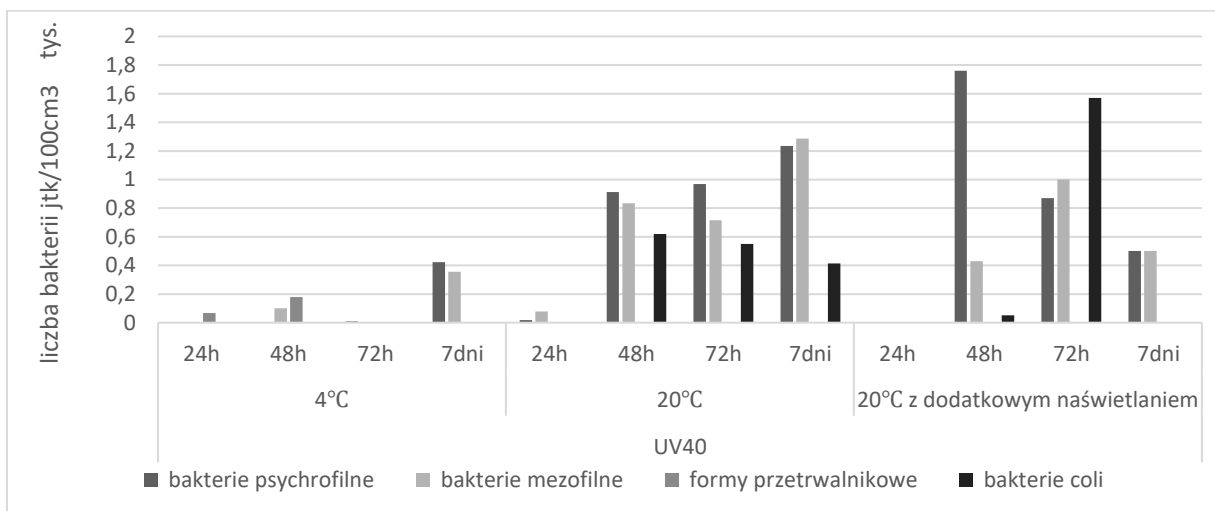
3.3.2. Wyniki badań stabilności mikrobiologicznej po procesie dezynfekcji promieniowaniem UV

Do oceny stabilności mikrobiologicznej po procesie dezynfekcji UV zastosowano ścieki po dezynfekcji o następującej jakości mikrobiologicznej: bakterie psychrofilne: max 2jtk/100cm³ (UV40) i 1x10¹jtk/100cm³ (UV100), bakterie mezofilne: max 5jtk/100cm³ (UV40) i 1,9x10¹jtk/100cm³ (UV100) oraz formy przetrwalnikujące max 2jtk/100cm³ (UV40) i 5jtk/100cm³ (UV100). Tylko w przypadku bakterii z grupy *coli* zredukowano ich liczebność do wartości wynoszącej 0 jtk/100cm³, dla obu zastosowanych prędkości przepływu ścieków przez promiennik.

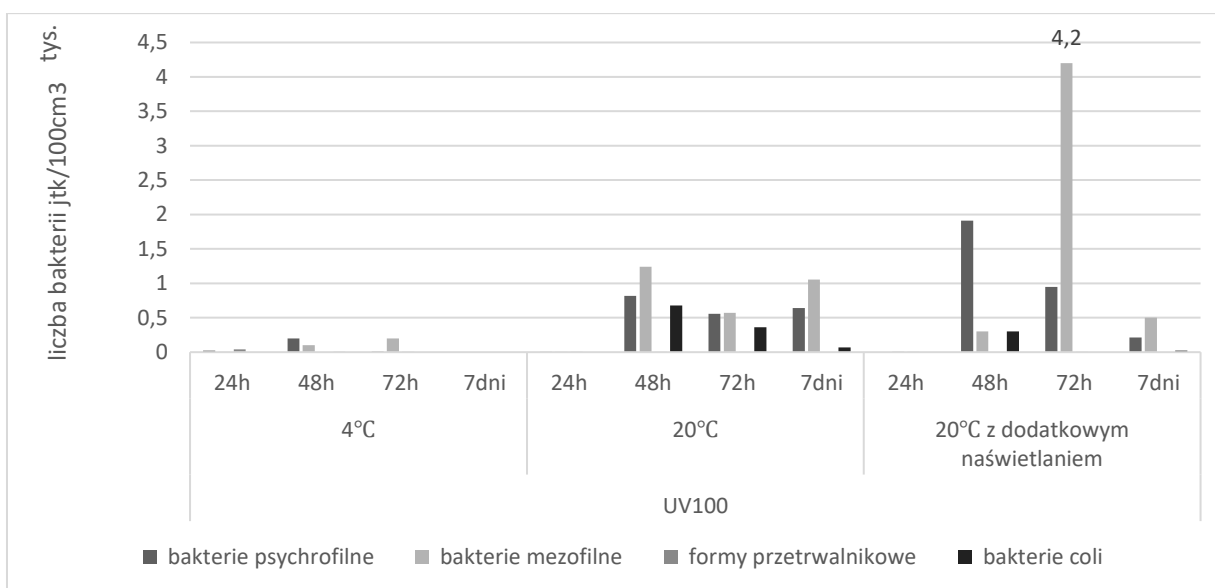
W próbach kontrolnych niższa temperatura umożliwiła bakteriom dłuższe przeżycie w ściekach. W ściekach inkubowanych w temperaturze 20°C dodatkowe naświetlenie spowodowało wzrost bakterii psychrofilnych oraz mezofilnych (wykres 30). Zaobserwowano również wzrost liczby bakterii w próbach po dezynfekcji UV zależny od temperatury. Najniższe liczebności bakterii odnotowano w próbach inkubowanych w temperaturze 4°C (wykres 31 i 32). W próbkach po dezynfekcji UV40 (wykres 31) po 24h zaobserwowano wzrost liczebności całej mikroflory. W próbach po dezynfekcji UV100 (wykres 30) doszło do znacznego wzrostu liczebności bakterii mezofilnych po 72h badania w warunkach dodatkowego naświetlania: ponad 4 tys. jtk/100cm³ (wykres 32). Ponownie najniższe liczebności populacji bakteryjnych odnotowano w temperaturze 4°C. W przypadku bakterii *coli* utrzymano efekt dezynfekcji tylko do 48 godziny badania.



Wykres 30. Całkowita liczba bakterii w próbce kontrolnej w kolejnych godzinach doświadczenia; załącznik 29



Wykres 31. Liczebność bakterii w próbce UV40 w kolejnych godzinach doświadczenia; załącznik 29



Wykres 32. Całkowita liczba bakterii w próbce UV100 w kolejnych godzinach doświadczenia; załącznik 29

Wartości stabilności mikrobiologicznej ścieków oczyszczonych po przeprowadzonym procesie dezynfekcji promieniowaniem UV zestawiono w tabelach 15 i 16.

Tabela 15. Wartości parametrów S dla UV40 dla poszczególnych rodzajów drobnoustrojów i wariantów inkubacji

UV40	Wartość „S”			
	bakterie psychrofilne	bakterie mezofilne	formy przetrwalnikowe	bakterie coli
4°C				
24h	2/2 =1	1/5 <1	6,9 x10 ¹ /2 >1	0/0 <1
48h	0/2 <1	1 x10 ² /5 >1	1,8 x10 ² /2 >1	2/0 >1
72h	1 x10 ¹ /2 >1	0/5 <1	3,5x10 ¹ /2 >1	1/0 >1
7 dni	4,23 x10 ² /2 >1	3,56 x10 ² /5 >1	0/2 <1	0/0 <1
20°C				
24h	1,7 x10 ¹ /2 >1	7,8 x10 ¹ /5 >1	1x10 ¹ /2 >1	0/0 <1
48h	9,13 x10 ² /2 >1	8,34 x10 ² /5 >1	2,2 x10 ¹ /2 =1	6,19x10 ² /0 >1
72h	9,68 x10 ² /2 >1	7,15 x10 ² /5 >1	1,1 x10 ¹ /2 >1	5,5 x10 ² /0 >1
7 dni	1,234 x10 ³ /2 >1	1,286 x10 ³ /5 >1	2/2 =1	4,13 x10 ² /0 >1
20°C z dodatkowym naświetlaniem				
24h	1/2 <1	0/5 <1	1 x10 ¹ /2 >1	0/0 <1
48h	1,76 x10 ³ /2 >1	4,3 x10 ² /5 >1	3/2 >1	5,2 x10 ¹ /0 >1
72h	8,7 x10 ² /2 >1	1 x10 ³ /5 >1	1,1 x10 ¹ /2 >1	1,57 x10 ³ /0 >1
7 dni	5 x10 ² /2 >1	5 x10 ² /5 >1	1/2 <1	0/0 <1

Tabela 16. Wartości parametrów S dla UV100 dla poszczególnych rodzajów drobnoustrojów i wariantów inkubacji

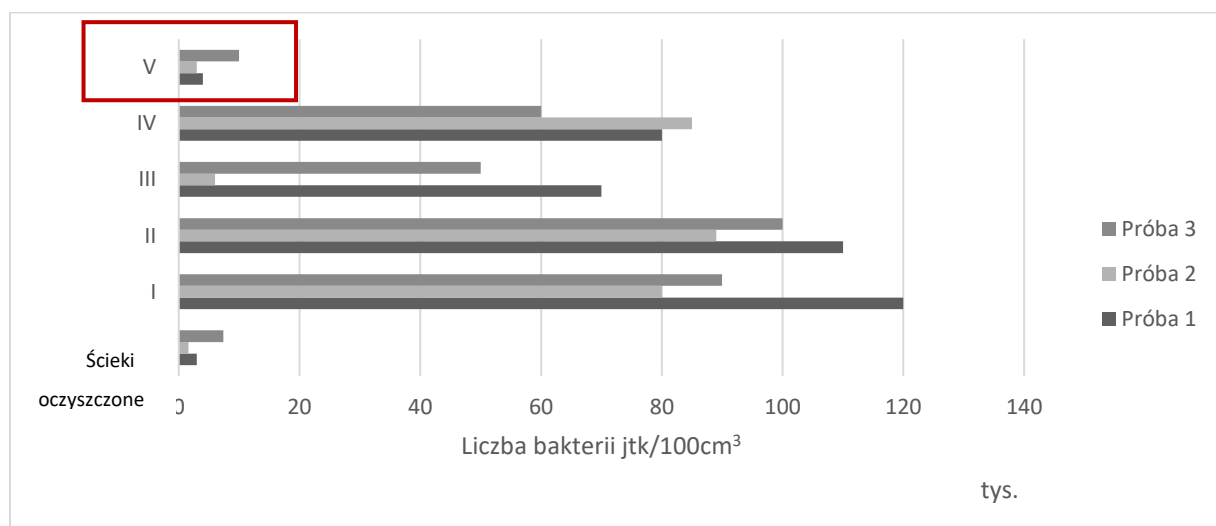
UV100	Wartość „S”			
	bakterie psychrofilne	bakterie mezofilne	formy przetrwalnikowe	bakterie coli
4°C				
24h	2,4 x10 ¹ /1 x10 ¹ >1	1/1,9 x10 ¹ <1	4,2 x10 ¹ /5 >1	0/0 <1
48h	2 x10 ² /1 x10 ¹ >1	1 x10 ² /1,9 x10 ¹ >1	1x10 ¹ /5 >1	6/0 >1
72h	1 x10 ¹ /1 x10 ¹ =1	2 x10 ² /1,9 x10 ¹ >1	2 x10 ¹ /5 >1	5/0 >1
7dni	0/1 x10 ¹ <1	0/1,9 x10 ¹ <1	0/5 <1	0/0 <1
20°C				
24h	2/1 x10 ¹ <1	3/1,9 x10 ¹ <1	2,1 x10 ¹ /5 >1	0/0 <1
48h	8,2 x10 ² /1 x10 ¹ >1	1,241 x10 ³ /1,9 x10 ¹ >1	1,5 x10 ¹ /5 >1	6,8 x10 ² /0 >1
72h	5,56 x10 ² /1 x10 ¹ >1	5,7 x10 ² /1,9 x10 ¹ >1	5/5 =1	3,64 x10 ² /0 >1
7dni	6,4 x10 ² /1 x10 ¹ >1	1,053 x10 ³ /1,9 x10 ¹ >1	0/0 <1	7,1 x10 ¹ /0 >1
20°C + dodatkowe naświetlanie				
24h	0/1 x10 ¹ <1	8/1,9 x10 ¹ <1	1,3 x10 ¹ /5 >1	0/0 <1
48h	1,91 x10 ³ /1 x10 ¹ >1	3 x10 ² /1,9 x10 ¹ >1	5/5 =1	3 x10 ² /0 >1
72h	9,5 x10 ² /1 x10 ¹ >1	4,2 x10 ³ /1,9 x10 ¹ >1	9/5 >1	0/0 <1
7dni	2,15 x10 ² /1 x10 ¹ >1	5 x10 ² /1,9 x10 ¹ >1	0/5 <1	2,4 x10 ¹ /0 >1

Stwierdzono brak stabilności mikrobiologicznej dla bakterii psychrofilnych, bakterii mezofilnych, form przetrwalnikujących oraz bakterii *coli* (odbudowa następuje już w 48 godzinie badania) do 7 dnia, czyli do końca trwania eksperymentu.

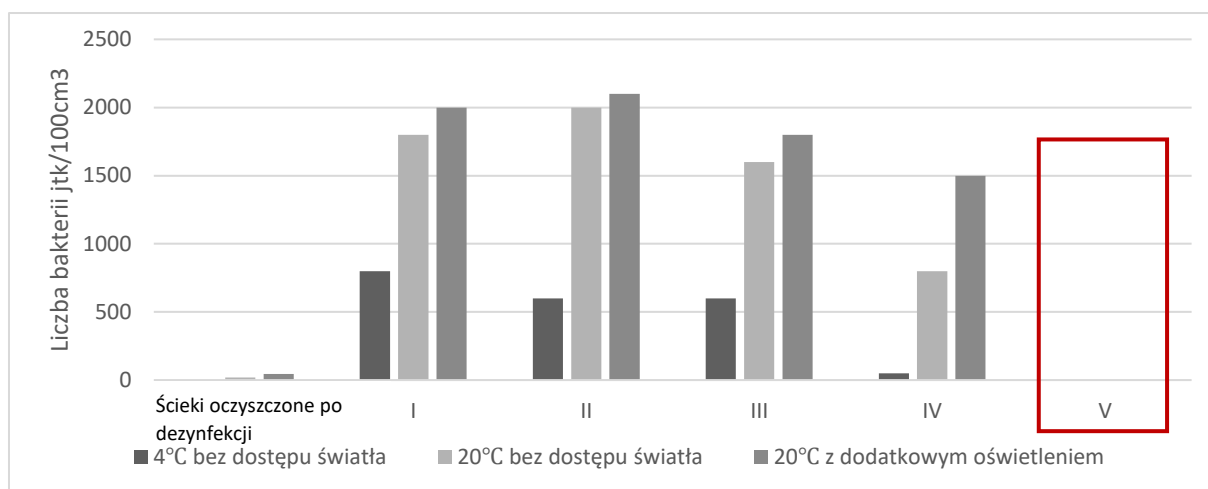
3.3.3. Określenie wpływu biopreparatów na jakość mikrobiologiczną ścieków po procesach dezynfekcji promieniowaniem UV

Po przeprowadzeniu dezynfekcji promieniami UVC w próbach ścieków nie wykryto bakterii *coli*. Do takich ścieków dodano biopreparaty. Utrzymanie efektu dezynfekcji – brak odtwarzania bakterii *coli*, zaobserwowano tylko w przypadku zastosowania mikroorganizmów z biopreparatu Em Bio, oddzielonymi od podłoża (wykres 33b). Wniosek ten koreluje z wynikami, jakie uzyskano po aplikacji biopreparatu Em Bio bezpośrednio do ścieków oczyszczonych – najlepszy wynik, czyli najniższą odbudowę bakterii po 24h, odnotowano dla próby V – biopreparat Em Bio z bakteriami oddzielonymi od podłoża (wykres 33a), z tego względu zdecydowano się na wybór tego biopreparatu i jego aplikację w ww. formie w badaniach łączących procesy UV z biopreparatami. W przypadku zastosowania mikroorganizmów z tego samego biopreparatu (EmBio) wraz z podłożem, na którym następuje ich namnożenie, nie obserwuje się zahamowania wzrostu liczebności bakterii.

Największą liczebność bakterii *coli* zaobserwowano w próbach z dodatkiem biopreparatu FreeFlow, w obu zastosowanych jego formach.



a) Ścieki oczyszczone



b) Ścieki oczyszczone po dezynfekcji

K – ścieki oczyszczone zdezynfekowane promieniami UVC

I – biopreparat FreeFlow w formie płynnej, bakterie namnożone na bulionie odżywczym

II – biopreparat FreeFlow w formie sypkiej (bakterie zliofilizowane)

III – biopreparat FreeFlow – bakterie oddzielone od podłoża

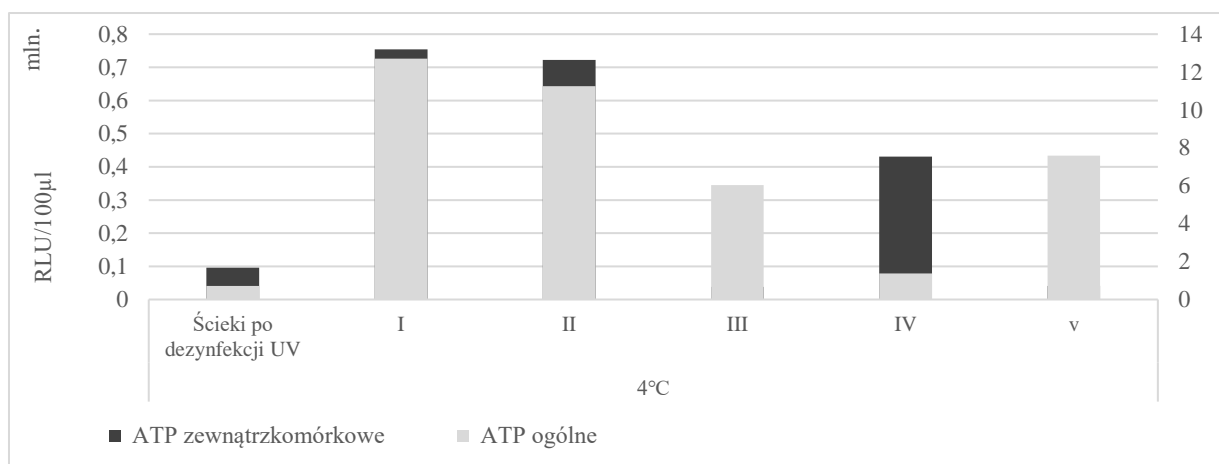
IV – biopreparat EmBio w formie płynnej

V – biopreparat EmBio – bakterie oddzielone od podłoża

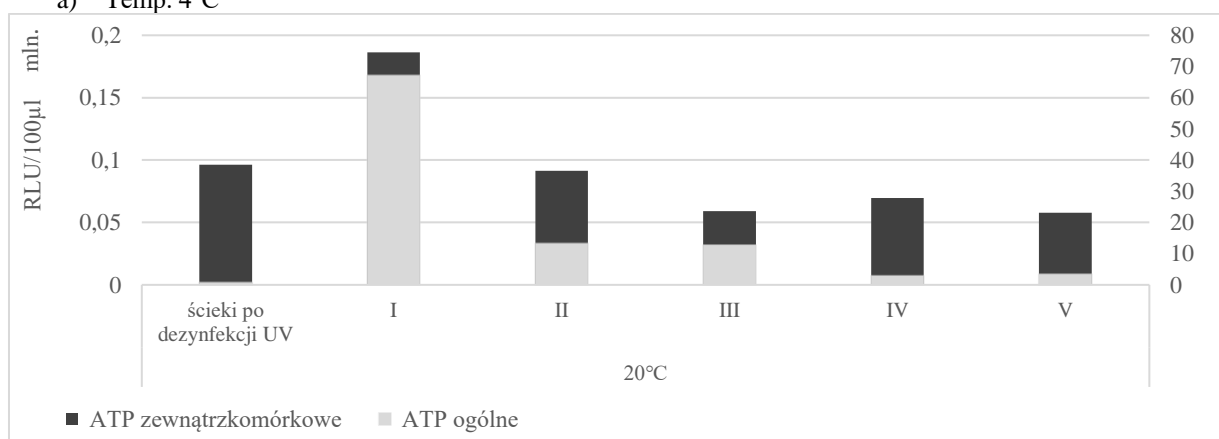
Wykres 33 a-b. Wpływ biopreparatów na liczebność bakterii *coli* w ściekach oczyszczonych i po dezynfekcji promieniami UV po 24h; załącznik 30

Uzyskane wyniki wskazują na wpływ temperatury i światła na odtwarzanie się mikroflory. We wszystkich wariantach próby umieszczone w 4°C charakteryzowały się najniższą liczbą odbudowanych bakterii *coli* (wykres 33b). W próbach bez dostępu światła liczebności bakterii *coli* są nieco mniejsze. Potwierdzałyby to fakt wolniej przebiegającej fotoreaktywacji w ciemności.

Zaobserwowano wzrost wartości RLU w porównaniu z próbą kontrolną w każdej próbie (wykres 34a-b). Potwierdzono również istotny wpływ temperatury na rozwój mikroorganizmów. W porównaniu z próbami umieszczonymi w temperaturze 20°C (wysoka wartość ATP ogólnego) w próbach umieszczonych w temperaturze 4°C, stężenie ATP jest niemal 6-krotnie niższe. Najwyższa odnotowana wartość RLU, dla próby z dodatkiem biopreparatu w temp. 20°C, wynosi ponad 67 mln. RLU, natomiast dla próby z dodatkiem biopreparatu w temp. 4°C, wynosi niecałe 13 mln. RLU.



a) Temp. 4°C

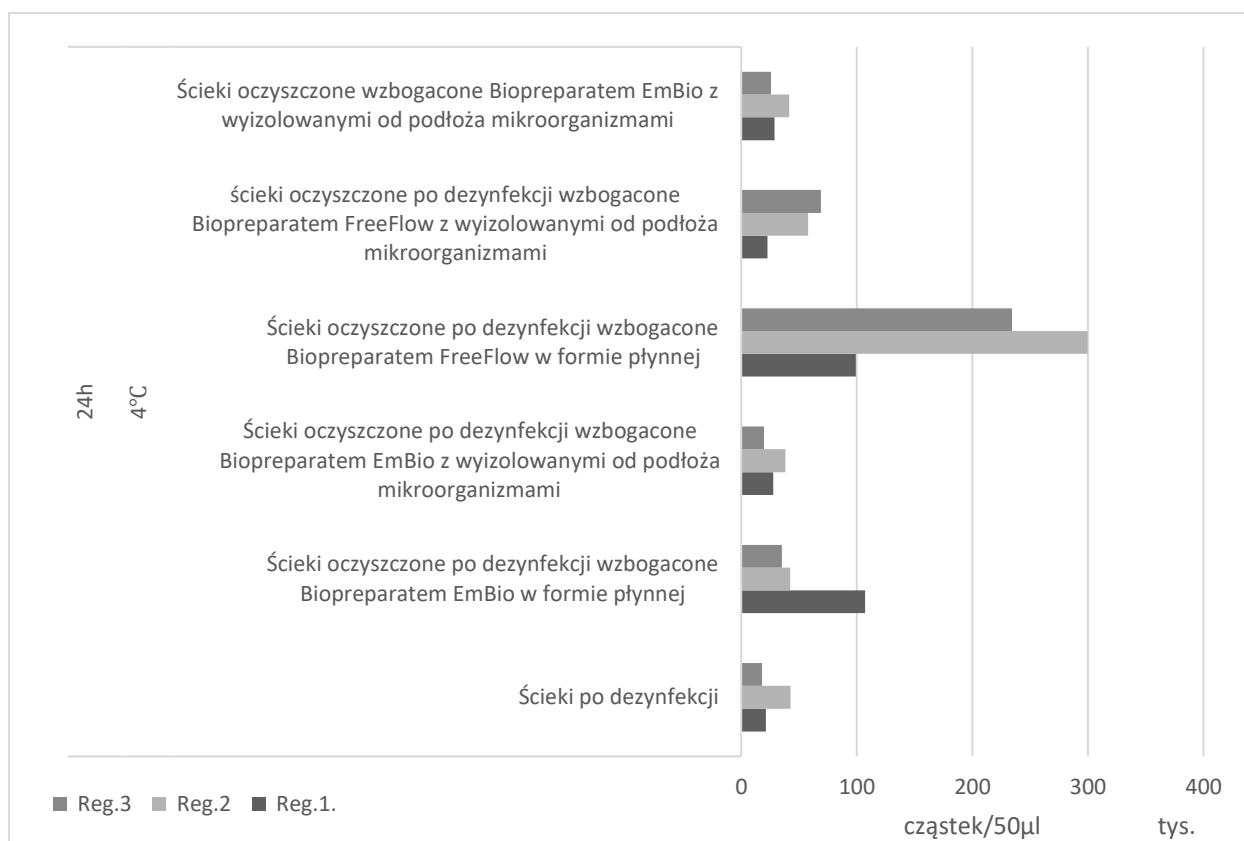


b) Temp. 20°C

- I – biopreparat FreeFlow w formie płynnej, bakterie namnożone na bulionie odżywczym
- II – biopreparat FreeFlow w formie sypkiej (bakterie zliofilizowane)
- III – biopreparat FreeFlow – bakterie oddzielone od podłoża
- IV – biopreparat EmBio w formie płynnej
- V – biopreparat EmBio – bakterie oddzielone od podłoża

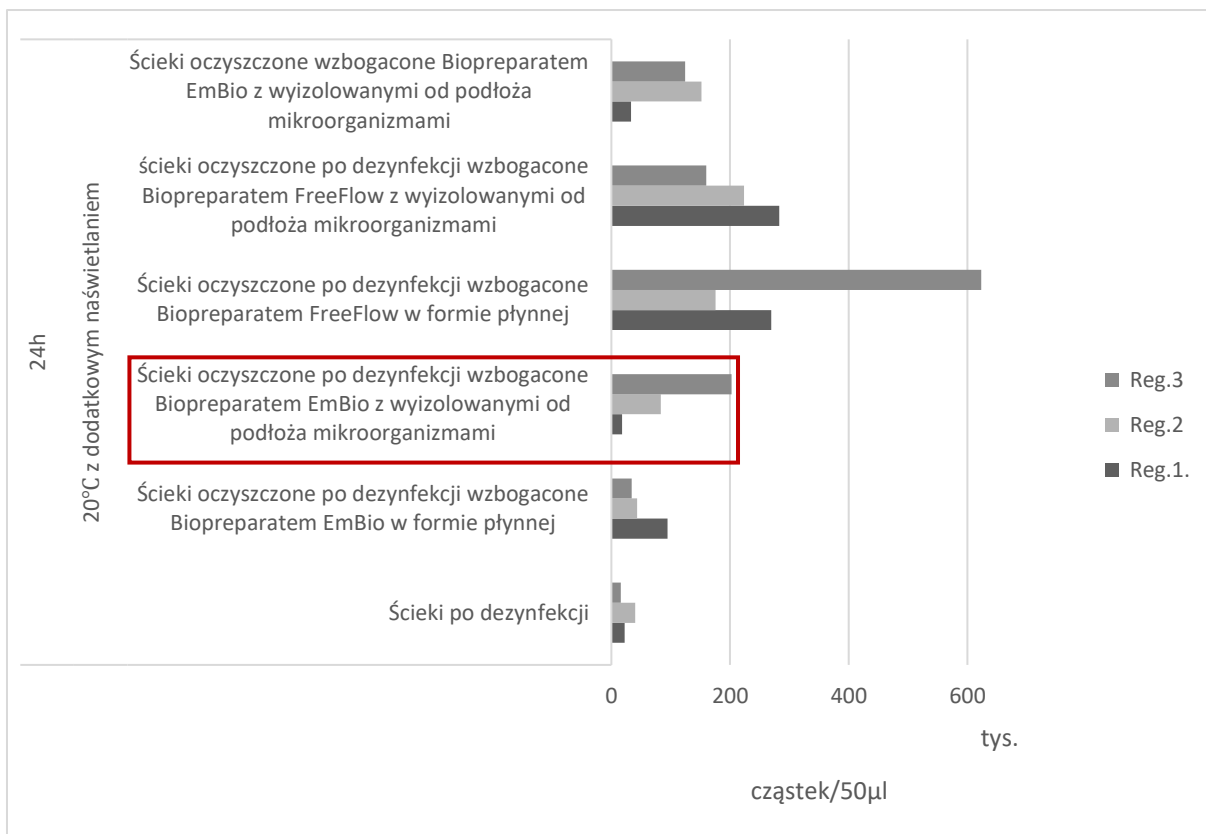
Wykres 34 a-b. Zmiany wartości RLU po 24h w ściekach po dezynfekcji UV i z dodatkiem biopreparatów – inkubowane w temp. 4 i 20°C; załącznik 31

Zdezynfekowane ścieki oczyszczone wzbogacone biopreparatem FreeFlow w formie płynnej, charakteryzowały się największą asymilacją mikroorganizmów – zaobserwowano najwyższy przyrost komórek bakteryjnych w każdej populacji, bez względu na zastosowaną temperaturę inkubacji czy dodatkowe naświetlanie. Próby inkubowane w temperaturze 4°C cechowały się mniejszym tempem przyrostu populacji bakteryjnych: maksymalna wartość wynosiła 300 tys. cząstek/50µl, przy średniej wynoszącej około 50 tys. cząstek/50µl. Wzrost temperatury do 20°C zaowocował maksymalnym wzrostem populacji bakteryjnej do wartości ponad 600 tys. cząstek/50µl. Ograniczenie światła spowodowało nieznaczne obniżenie liczebności populacji – do około 540 tys. cząstek/50µl (wykresy 35-37).

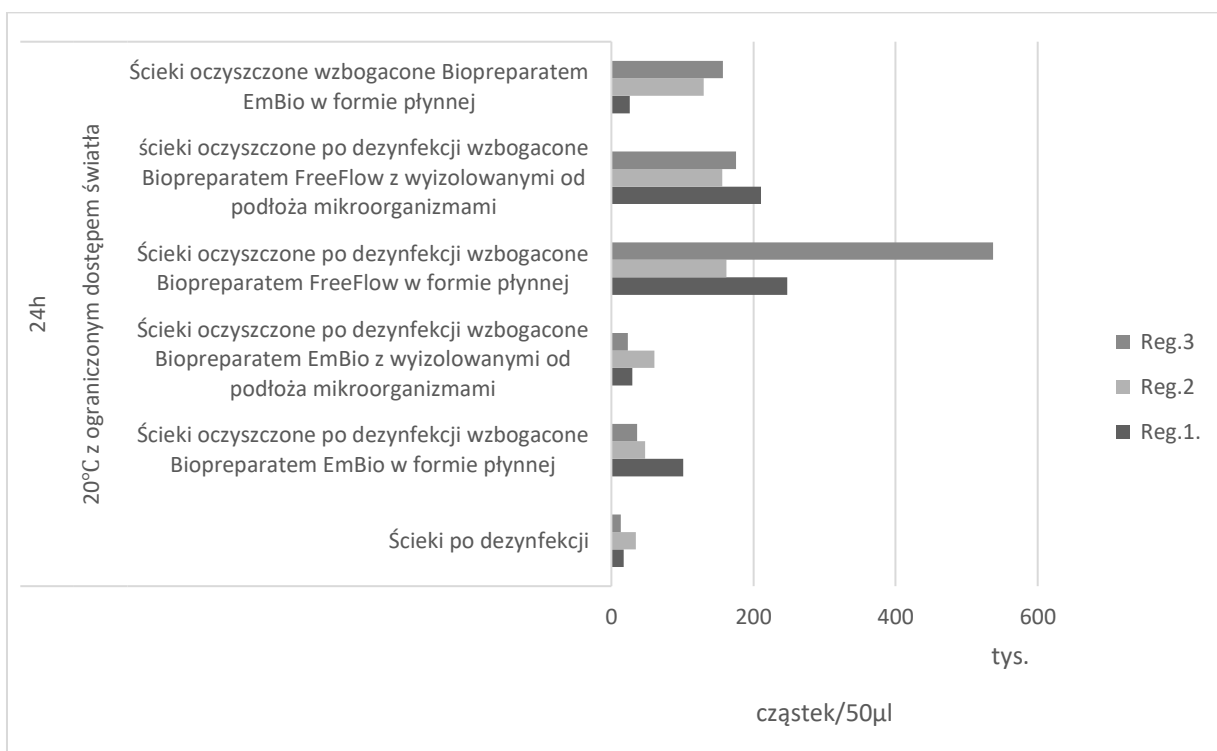


Wykres 35. Analiza FCM po 24h w ściekach po dezynfekcji UV i z dodatkiem biopreparatów – inkubowane w temp. 4°C; załącznik 32

Warunki inkubacji prób 20°C z dodatkowym naświetlaniem spowodowały znaczący wzrost populacji regionu 3, tzn. żywych komórek bakteryjnych, w ściekach oczyszczonych po dezynfekcji, wzboganych biopreparatem EmBio z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami (wykres 36).

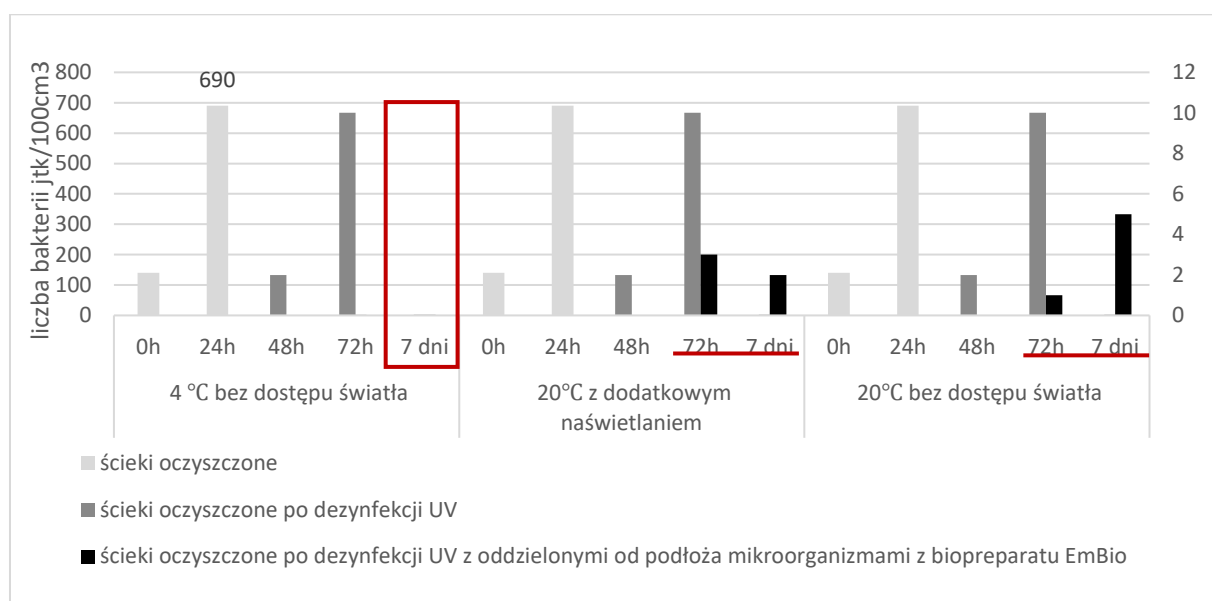


Wykres 36. Analiza FCM po 24h w ściekach po dezynfekcji UV i z dodatkiem biopreparatów – inkubowane w temp. 20°C z dodatkowym naświetlaniem; załącznik 32



Wykres 37. Analiza FCM po 24h w ściekach po dezynfekcji UV i z dodatkiem biopreparatów – inkubowane w temp. 20°C z ograniczonym dostępem światła; załącznik 32

W drugim etapie eksperymentu zbadano wpływ biopreparatów na jakość mikrobiologiczną ścieków po procesach dezynfekcji w czasie do 7 dni. W ściekach oczyszczonych odnotowano spadek liczby bakterii *coli* w ściekach, który nastąpił po 24h z wartości $7,4 \times 10^3$ jtk/100cm³ do wartości $1,8 \times 10^2$ jtk/100cm³. W próbach po dezynfekcji promieniowaniem UV odnotowano odbudowę bakterii *coli* w ściekach w 48h od momentu dezynfekcji. Po upływie 72h liczebność bakterii *coli* w próbce zaczęła spadać. Dodanie wyizolowanych z biopreparatu mikroorganizmów (bez podłoża) pozwoliło na wydłużenie efektu dezynfekcji: w temperaturze 4°C nawet powyżej 7 dni. Dla wyższych temperatur 20°C odbudowa bakterii *coli* następowała po 72h od momentu dezynfekcji (wykres 38).



Wykres 38. Liczebność bakterii *coli* w próbach ścieków oczyszczonych – K, po dezynfekcji (UV) oraz z dodatkem mikroorganizmów z biopreparatu EM Bio; załącznik 30

3.3.4. Dyskusja

Dezynfekcja ultrafioletem (UV) jest coraz częściej stosowana w oczyszczalniach ścieków. W procesie dezynfekcji najskuteczniejsze jest promieniowanie UV z zakresu UV-B i UV-C. Najbardziej niebezpieczne dla organizmów żywych – czyli najskuteczniejsze w dezynfekcji – są fale UV-C [428]. Promieniowanie UV przenika przez ściany komórkowej mikroorganizmów, trwale uszkadzając ich strukturę DNA, co powoduje ich niezdolność do rozmnażania się [235]. Promieniowanie UV-C powoduje zmiany w kwasach nukleinowych drobnoustrojów, takie jak przerwanie łańcucha RNA lub DNA, denaturację białek, powstawanie dimerów pirymidynowych, które zniekształcają nić i utrudniają jej odtworzenie [429]. Powoduje też powstawanie wiązań pomiędzy DNA i białkami, wiązań krzyżowych

między dwiema niciami DNA, a także tworzenie się dimerów śmiertelnych dla komórek pomiędzy resztkami tyminy w tej samej nici DNA [430].

Stopień wrażliwości drobnoustrojów zależy od kilku czynników, wśród których można wyróżnić rodzaj, formę, wiek i wielkość drobnoustrojów, ich stan fizjologiczny, czynniki środowiskowe [240]. Na przykład do inaktywacji bakterii i wirusów potrzebna jest niższa dawka promieniowania niż w przypadku pleśni i drożdży, a formy wegetatywne są bardziej wrażliwe, przez co wymagają niższej dawki dezynfektanta niż formy zarodnikowe. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów potwierdzają powyższą tezę. Promieniowanie UV okazało się skuteczne (we wszystkich zastosowanych dawkach) w eliminacji bakterii *coli* i *E. coli* ze ścieków, jednak było niewystarczające do całkowitej eliminacji bakterii mezofilnych, psychrofilnych czy form przetrwalnikowych (odnotowano bardzo wysoki stopień ich redukcji!). Na uwagę zasługuje również fakt, że wraz ze zwiększaniem dawki promieniowania liczba bakterii każdego rodzaju malała, a różnica między próbą kontrolną (ściekami oczyszczonymi) a ściekami po dezynfekcji wynosiła trzy rzędy wielkości. Przykładowo, wartości początkowe dla ścieków oczyszczonych wynosiły kolejno: $4,26 \times 10^3$ jtk/100cm³, $1,16 \times 10^3$ jtk/100cm³, $1,06 \times 10^2$ jtk/100cm³ dla bakterii psychrofilnych, mezofilnych i form przetrwalnikowych, natomiast po dezynfekcji UV100 kolejno: 4 jtk/100cm³, 1 jtk/100cm³ oraz 2×10^1 jtk/100cm³ (załącznik 19 seria 2).

W badaniach wykorzystano czas ekspozycji: 30,7 s. (UV100), na podstawie obliczeń ustalono, że średnia dawka promieniowania UV wynosi 153,5 mJ/cm². Należy jednak pamiętać, że minimalną skuteczną dawkę promieniowania (UVDE), która zapewnia wymagany poziom dezaktywacji rozważanych mikroorganizmów, można określić dość łatwo, gdy stosuje się reaktory wsadowe. Powodem tego jest fakt, że cała zawartość takiego reaktora może być utrzymywana przez dowolnie długi czas w zakresie promieniowania o znanej intensywności. W przypadku reaktorów przepływowych problem staje się skomplikowany, ponieważ płyn jedynie przepływa przez reaktor. Stosowanie matematycznych metod obliczenia dawek UV może być zatem obarczone pewnym błędem [382]. Wyliczona dawka 153,5 mJ/cm², związana z prędkością przepływu UV100, jest najniższą dawką promieniowania, którą może wytworzyć system dozujący użyty w badaniach (maksymalna prędkość przepływu UV100 – najkrótszy czas kontaktu dezynfektanta z próbą: 30,7 s/dm³).

Na podstawie dostępnej literatury naukowej należy stwierdzić, że dawki promieniowania UV wykorzystywane do dezynfekcji ścieków oczyszczonych są różne i zależą od wielu czynników, takich jak rodzaj mikroorganizmów, jakość wody, typ systemu UV i inne parametry. Przykładowo, w badaniach Gonzalez i in. [242] zalecano stosowanie minimalnej dawki 40

mJ/cm² jako wystarczającej do skutecznej dezynfekcji i zmniejszenia prawdopodobieństwa reaktywacji mikroorganizmów. Podobne wartości wykazano w badaniu przeprowadzonym przez Lazarotto i in. [431] gdzie zastosowano różne dawki promieniowania UV, takie jak 3.6; 9.0; 18 i 36 mJ/cm², które spowodowało redukcję większą niż 2 log *coli* i *E. coli*, przy zastosowanych dawkach 18 i 36 mJ/cm², jednak nie doprowadziło do całkowitej dezynfekcji. Salcedo Dávila i in.[432] stwierdzili natomiast, że średnia dawka UV wynosząca 50 mJ/cm² jest wystarczająca, aby spełnić obowiązujące w Hiszpanii standardy jakości mikrobiologicznej. Z kolei Nguyen i in. [433] zaobserwowali, że inaktywacja bakterii zależy od zastosowanej dawki UV, stwierdzając, że przy dawce $47,8 \pm 1,6$ mJ/cm² następuje redukcja colifagów MS2 wynosząca $2,6 \pm 0,1$ uLog, podczas gdy przy dawce $69,4 \pm 3,8$ mJ/cm² poziom redukcji wzrasta do $3,7 \pm 0,2$ uLog.

Silve i in.[434] stwierdzili skuteczność usuwania bakterii ze ścieków odprowadzanych z miejskich oczyszczalni ścieków na poziomie 98,4%, przy dawce 29,74 mJ/cm². Rodríguez-Chueca i in.[435] badali natomiast dawki między 42–170 mJ/cm², uzyskując skuteczność usuwania mikrozanieczyszczeń na poziomie 90% przy użyciu 16 lamp o mocy 95 W i czasie kontaktu między 4 a 18 s. Dawki między 100 a 300 mJ/cm² pozwoliły na skuteczne usunięcie bakterii z grupy *coli* na poziomie 99,97% przy użyciu 8 lamp o mocy 20 W i czasie kontaktu między 10 a 30 min (Caretti i in.[436]). Wysokie dawki promieniowania UV wynoszące 913 mJ/cm² zastosowano w badaniach dotyczących inaktywacji *Escherichia coli* O157:H7. Zaobserwowano tam, że wysoka dawka promieniowania UV (wynosząca 913 mJ/cm²) powodowała uszkodzenia błony komórkowej bakterii – pozostawała nienaruszona przy niższych dawkach wynoszących od 0 do 203 mJ/cm² [242,432]. W badaniu przeprowadzonym przez Milani i in.[437] stwierdzono z kolei, że dawka 1048 mJ/cm², promieniowania UVC jest dawką optymalną do całkowitej dezynfekcji, w tym do inaktywacji m.in. wirusa SARS-CoV-23.

Porównując wartości literaturowe z wyliczonymi w pracy dawkami promieniowania UV, należy stwierdzić, że dawki zastosowane w badaniach są zgodne z literaturą. Różnice w dawkach mogą wynikać zarówno z różnic w parametrach zastosowanych systemów – takich jak moc lampy, objętość ścieków przepływających przez lampę, czasu ekspozycji – jak i innych czynników. Dodatkowo trzeba zwrócić uwagę na fakt, że w celu określenia skuteczności promiennika przeprowadza się badania eksperymentalne z wykorzystaniem organizmów wskaźnikowych. Jako organizmy wskaźnikowe najczęściej wykorzystuje się bakteriofagi MS2, zarodniki *Bacillus subtilis* lub oocysty *Cryptosporidium parvum*. Bakterie, w tym bakterie z grupy *coli*, które są absorbowane w różnych ilościach przez cząstki zawiesiny, nie są zbyt precyzyjne [230]. Nie można zatem uznać, że jedna dawka promieniowania jest optymalna do

usunięcia wszystkich rodzajów mikroorganizmów, dużo zależy od tego, który rodzaj przyjmujemy za wskaźnikowy. Dlatego też dawki promieniowania UV są zwykle dostosowywane do konkretnych warunków i wymagań systemu dezynfekcji UV [382].

Jeśli ilość tych dwóch czynników (dawki lub czasu) nie jest wystarczająca, może nastąpić ponowny rozwój drobnoustrojów [438] – zjawisko regeneracji [439]. Bakterie, aby przeciwdziałać szkodliwym skutkom promieniowania, wykształciły mechanizmy pozwalające im na naprawę uszkodzonego materiału genetycznego. Rozróżnia się reparację ciemną oraz naprawę światłem (fotoaktywację). Zaproponowano trzy mechanizmy naprawy ciemnej: naprawę przez wycięcie, naprawę rekombinacyjną i naprawę podatną na błędy SOS [440]. Wycięcie jest dominującą formą mechanizmu naprawy w ciemności, w którym naprawa odbywa się poprzez fizyczne nacięcie (wycięcie) dimeru z uszkodzonej nici DNA przez kompleks enzymatyczny. Nadal nie wiemy, jakie mechanizmy dominują w zjawisku rekonstrukcji komórek. Ciemna naprawa jest znacznie wolniejsza niż fotoreaktywacja. Fotoreaktywacja jest natomiast katalizowana przez enzym fotoliazę w obecności światła widzialnego ($\lambda = 370 \text{ nm}$). Energia fotonów światła ($h\nu$) powoduje rozszczepienie dimeru, co prowadzi do transformacji cząsteczek DNA. Po naprawie odzyskują zdolność do replikacji i zakażenia żywiciela w sposób podobny do stanu przed inaktywacją wywołaną promieniowaniem UV. Fotoaktywacja zachodzi podczas ekspozycji na światło widzialne i zachodzi m.in. u bakterii z grupy *coli* [429]. Organizmy reagujące na fotoreaktywację wymagają 2,2 razy więcej promieniowania UV, aby osiągnąć 90% dezaktywację w porównaniu z organizmami, które nie ulegają fotoreaktywacji [441]. Jednakże fotoreaktywacja nie wydaje się być szczególnie znacząca w pełnej skali, ponieważ jest to mechanizm występujący głównie przy niskich dawkach UV. Guo i in.[442] stwierdzili, że fotoreaktywacja *E. coli* (przy początkowym stężeniu wynoszącym $10^2 \text{ jtk}/100\text{mL}$) wynosiła około 50% jedynie dla dawki UV równej $5 \text{ mJ}/\text{cm}^2$. Nie wykryto fotoreaktywacji dla dawki UV wynoszącej $15 \text{ mJ}/\text{cm}^2$. W przypadku bakterii z grupy *coli* ogółem (przy początkowej liczebności wynoszącej $9,6 \times 10^4 \text{ jtk}/100\text{mL}$ – $2,5 \times 10^5 \text{ jtk}/100\text{mL}$) przy dawce UV $40 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ odsetek fotoreaktywacji był mniejszy niż 1%. Podobne badania przeprowadzili Hallmich i Gehr [429] oraz Guo i in.[443,249]. Z kolei w badaniach Somnath Basu [230] zaobserwowano szybki wzrost koncentracji bakterii z grupy *coli* i stosunku bakterii z grupy *coli* do całkowitej liczby bakterii pomiędzy 24 a 48 godzinami po dezynfekcji UV w porównaniu do liczebności bezpośrednio po zastosowaniu UV. Tempo wzrostu stopniowo malało po 72 godzinach do 144 godzin. Podobne zależności zauważono w prezentowanych badaniach, gdzie stwierdzono brak długoterminowej skuteczności działania dezynfekcyjnego i po pewnym czasie zauważono odbudowę bakterii z grupy *coli* i innych mikroorganizmów. Rekonstrukcja bakteryjna następowała po około 48

godzin od momentu dezynfekcji promieniami UV (nawet przy zastosowaniu bardzo dużych dawek: dla UV100: 153,5 mJ/cm², a dla UV40: 390,0 mJ/cm²) i efekt ten w warunkach trwałej hodowli utrzymywał się przeważnie do 72 godzin. Dodanie wyizolowanych z biopreparatu mikroorganizmów (bez podłoża) pozwoliło na wydłużenie efektu dezynfekcji: w temperaturze 4°C nawet powyżej 7 dni, natomiast dla wyższych temperatur (20°C) odbudowa bakterii *coli* następowała po 72h od momentu dezynfekcji.

Dezynfekcja UV nie wykazuje oczywistego wpływu na całkowitą względną liczebność wolno żyjących bakterii chorobotwórczych w ściekach. Chociaż w procesie oczyszczania ścieków eliminuje się duże ilości patogenów związanych z cząsteczkami, oczyszczalnie ścieków nie są w stanie skutecznie usunąć wolno żyjących patogenów bakteryjnych, a niektóre bakterie chorobotwórcze (np. *Pseudomonas aeruginosa*) obecne w ściekach mają większą względną liczebność po dezynfekcji promieniowaniem UV [152].

3.4. Wykorzystanie ozonowania w dezynfekcji ścieków oczyszczonych

3.4.1. Określenie skuteczności zastosowanych dawek ozonu

Początkowa liczebność bakterii w ściekach oczyszczonych wynosiła kolejno: min $1,275 \times 10^4$ i max $1,8 \times 10^4$ jtk/100cm³ dla bakterii psychrofilnych, min $1,325 \times 10^4$ i max 4×10^4 jtk/100cm³ dla bakterii mezofilnych, min $1,2 \times 10^4$ i max $4,1 \times 10^4$ jtk/100cm³ dla bakterii *coli* oraz min $4,5 \times 10^3$ max $6,5 \times 10^3$ jtk/100cm³ dla bakterii *E. coli*. Przeprowadzone badania wykazały, że wraz ze wzrostem czasu trwania ozonowania zmniejszała się liczebność bakterii psychrofilnych, mezofilnych i bakterii z grupy *coli* w ściekach. Nawet przy długotrwałym ozonowaniu nie wszystkie mikroorganizmy zostały jednak całkowicie usunięte. Czas ozonowania (9 minut) okazał się niewystarczający do zupełnej eliminacji bakterii psychrofilnych i mezofilnych. Okazał się natomiast satysfakcjonujący dla bakterii *coli* i *E. coli*. Już po 1 minucie dezynfekcji ozonem liczebność bakterii *E. coli* znacząco spadła – redukcja minimum 67%. Skuteczność ta wzrastała wraz z wydłużaniem czasu ozonowania (tabela 17).

Tabela 17. Wpływ czasu ozonowania na efekt dezynfekcji; załącznik 33

	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
Wersja 1					
Bakterie psychrofilne	86%	95%	98%	99%	≈100%
Bakterie mezofilne	74%	94%	97%	99%	≈100%
Bakterie <i>coli</i>	76%	94%	96%	99%	≈100%
Bakterie <i>E. coli</i>	82%	93%	96%	99%	≈100%
Wersja 2					
Bakterie psychrofilne	79%	96%	99%	99%	≈100%
Bakterie mezofilne	60%	77%	96%	99%	≈100%
Bakterie <i>coli</i>	73%	78%	97%	99%	100%
Bakterie <i>E. coli</i>	67%	76%	93%	99%	100%

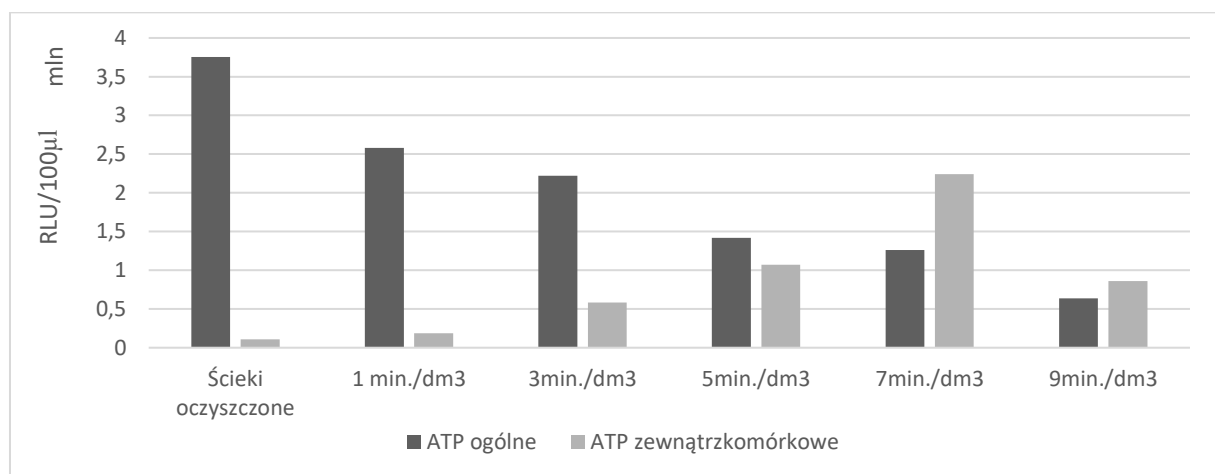
W próbach po dezynfekcji ozonem stwierdzono całkowitą eliminację bakterii z grupy *coli* tylko w próbie ścieków ozonowanej przez 9 minut (w drugiej wersji badań). Uzyskane wyniki wskazują jednak, że zastosowany czas ozonowania ścieków nie był wystarczający do całkowitego usunięcia mikroorganizmów. W dalszym ciągu, po 9-minutowym ozonowaniu, w ściekach pozostało kolejno: min 0 jtk/100cm³ i max 2×10^1 jtk/100cm³ bakterii psychrofilnych, min 1 jtk/100cm³ max $2,3 \times 10^1$ jtk/100cm³ bakterii mezofilnych oraz max 9 jtk/100cm³ bakterii *coli* (w serii 1).

W drugiej serii rozszerzono badanie skuteczności dezynfekcji ozonem do 15 minut (tabela 18). Ozonowanie ścieków przez 11 minut okazało się wystarczające do całkowitego usunięcia bakterii psychrofilnych, bakterii mezofilnych, bakterii *coli* i *E. coli*.

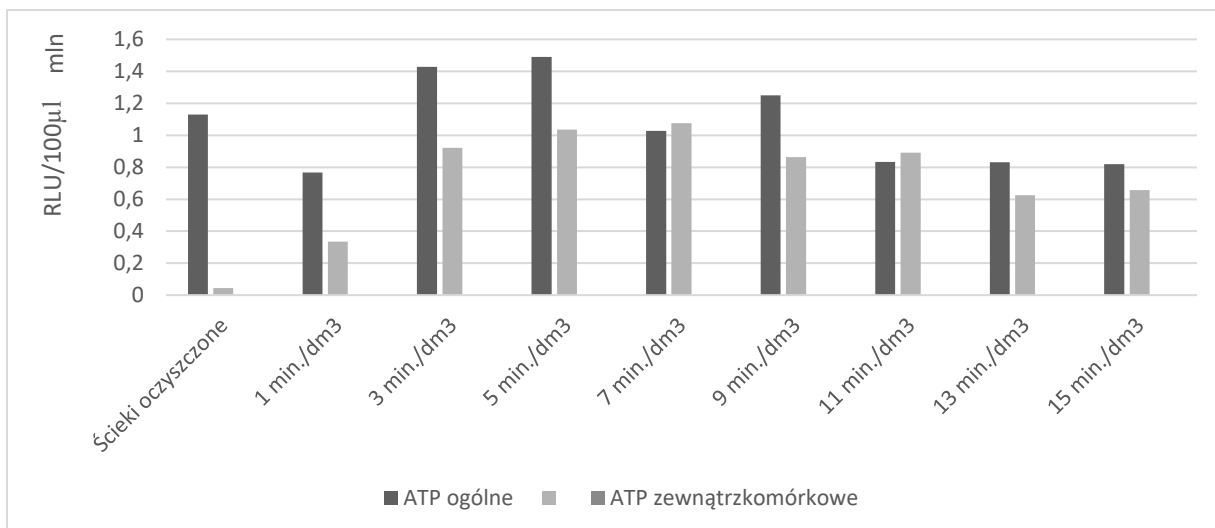
Tabela 18. Skuteczność działania ozonu w eliminacji bakterii; załącznik 34

próba	Bakterie psychrofilne	Bakterie mezofilne	Bakterie coli	Bakterie <i>E. coli</i>
1 minuta	97%	96%	50%	80%
3 minuty	97%	98,5%	74%	91%
5 minut	99%	99%	97%	97%
7 minut	99,5%	99,5%	99,5%	99,5%
9 minut	99,9%	99,9%	99,9%	100%
11 minut	100%	100%	100%	100%
13 minut	100%	100%	100%	100%
15 minut	100%	100%	100%	100%

Wyniki analizy luminometrycznej ATP (wykresy 39 i 40) potwierdzają skuteczność przeprowadzonych procesów dezynfekcji. Próby kontrolne (ścieki oczyszczone) każdorazowo charakteryzują się wysoką wartością RLU ogólnego przy stosunkowo niskiej wartości RLU zewnątrzkomórkowego. Wprowadzenie ozonu do ścieków powoduje systematyczny wzrost wartości RLU zewnątrzkomórkowego przy jednoczesnym spadku ATP ogólnego wraz z wydłużeniem czasu kontaktu dezynfektanta ze ściekami.

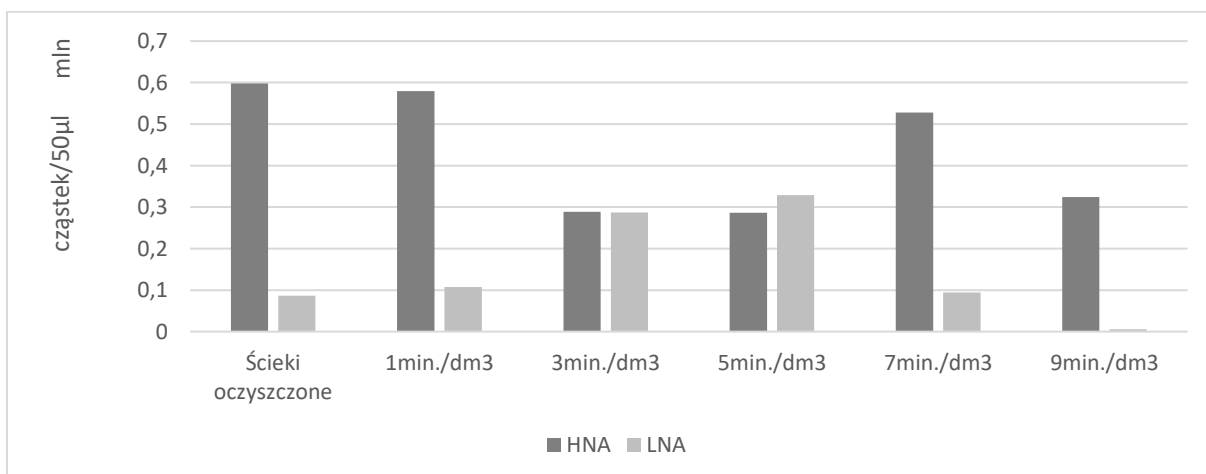


Wykres 39. Zmiany wartości RLU dla różnych czasów dezynfekcji ozonem w serii 1; załącznik 35

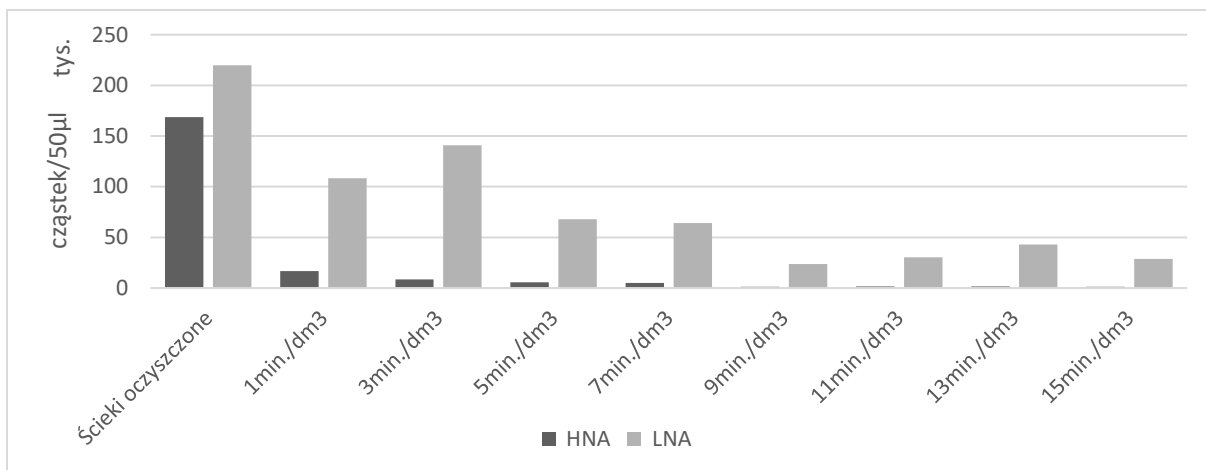


Wykres 40. Zmiany wartości RLU dla różnych czasów dezynfekcji ozonem w serii 2; załącznik 36

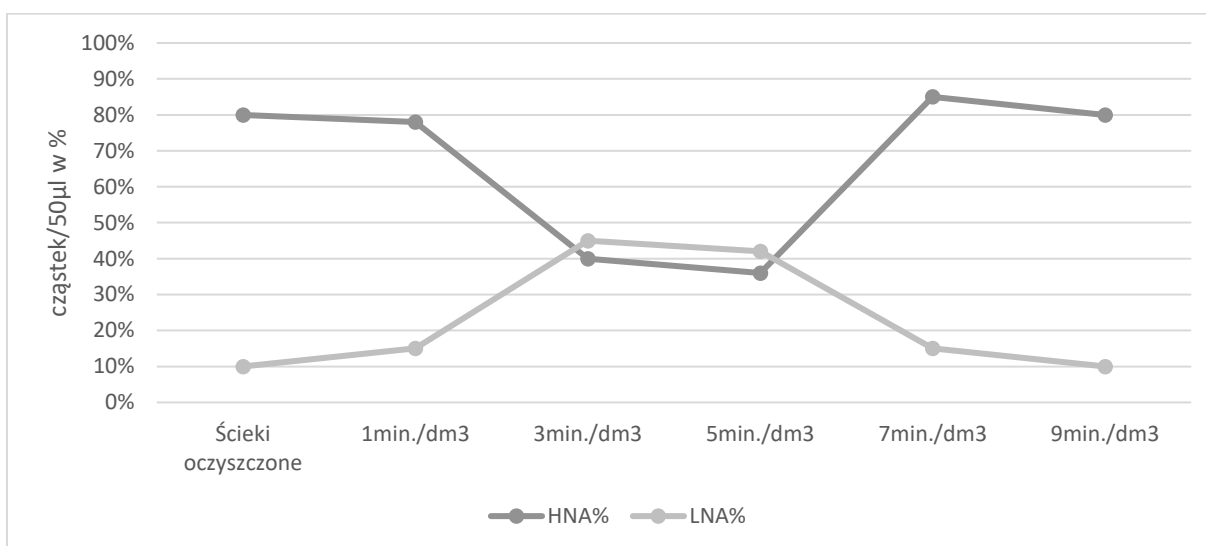
Analiza cytometrii przepływowej FCM (wykresy 41-44) koreluje z wynikami analizy ATP. Wraz ze zwiększeniem dawki dezynfektanta (czasu kontaktu) rośnie liczebność populacji LNA, charakteryzującej bakterie martwe i/lub uszkodzone. Jednocześnie maleje populacja bakterii żywych HNA.



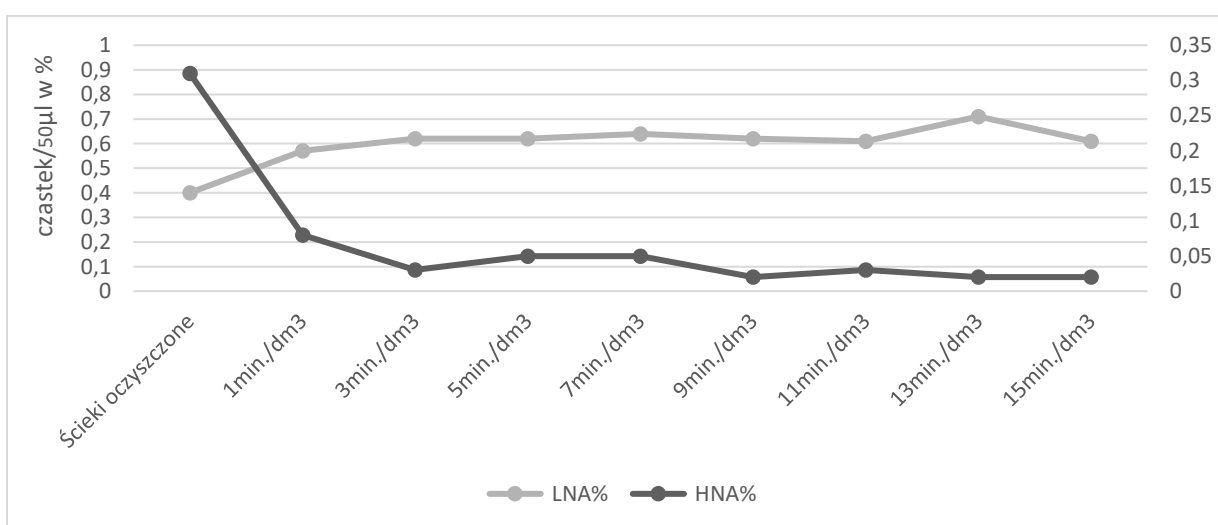
Wykres 41. Analiza FCM. Wpływ na liczbę komórek martwych [LNA] i komórek żywych [HNA] podczas dezynfekcji ozonem; załącznik 37



Wykres 42. Analiza FCM. Wpływ czasu ozonowania na liczbę komórek martwych [LNA] i komórek żywych [HNA]; załącznik 38

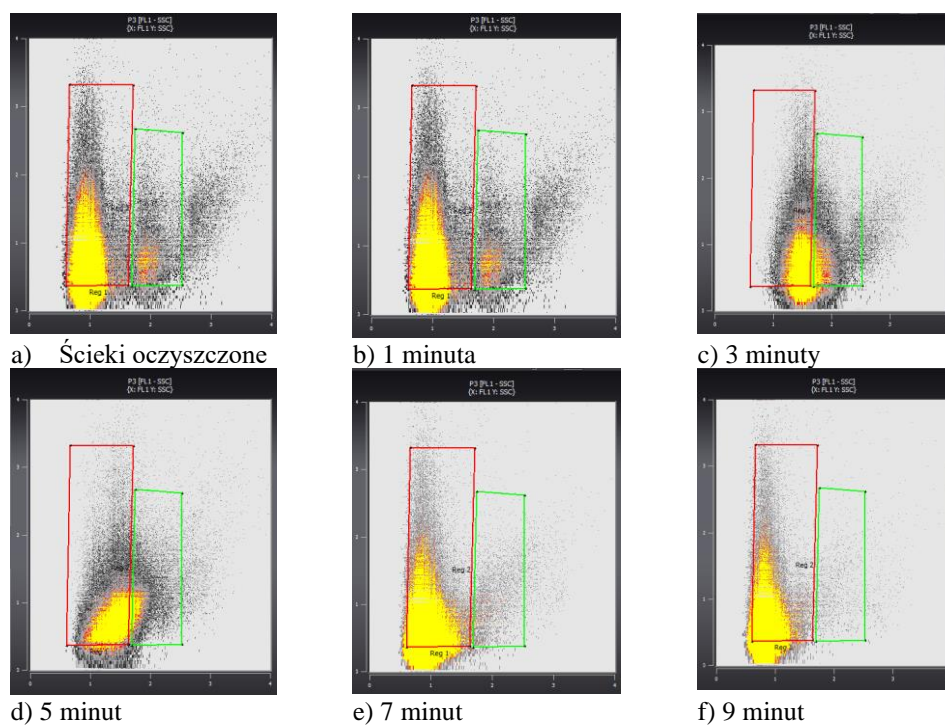


Wykres 43. Analiza FCM. Wpływ czasu ozonowania na liczbę komórek martwych [LNA] i komórek żywych [HNA]; załącznik 37

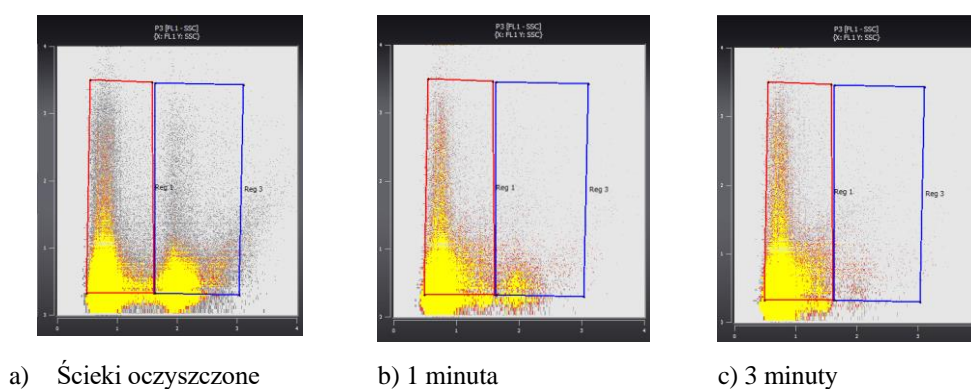


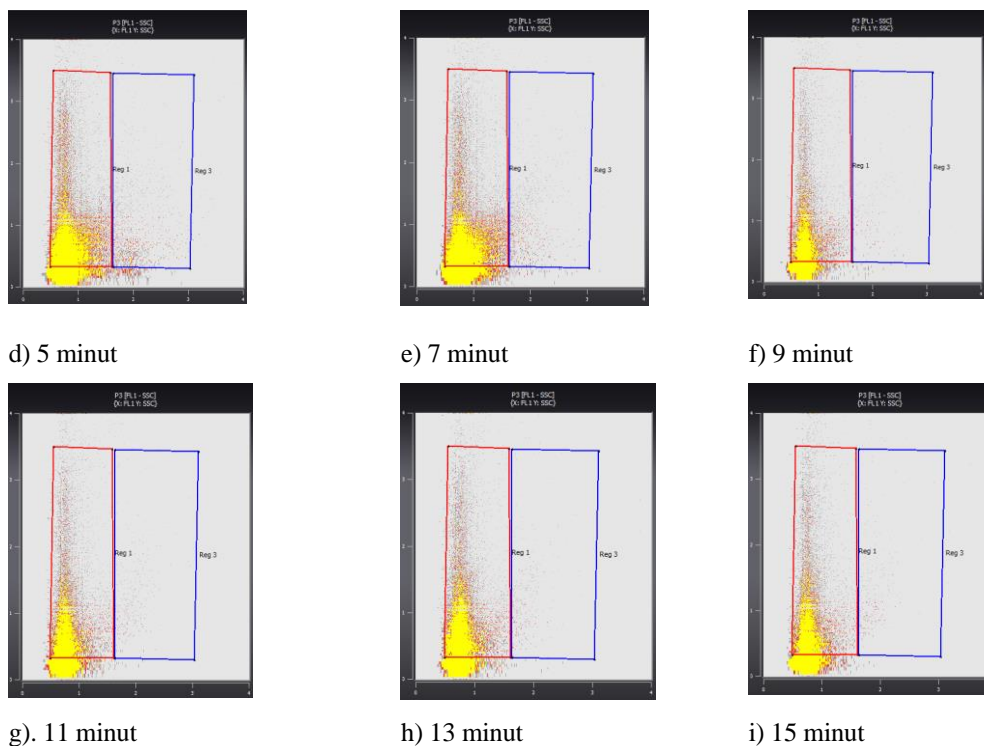
Wykres 44. Analiza FCM. Wpływ czasu ozonowania na liczbę komórek żywych [HNA] i komórek martwych [LNA] – zależność w procentach; załącznik 38

Wyniki oznaczeń cytometrem przepływowym potwierdziły skuteczność dezynfekcji oczyszczonych ścieków z zastosowaniem ozonu. Próba kontrolna charakteryzowała się dużą liczbą żywych cząstek HNA. Wraz z czasem trwania dezynfekcji (zwiększeniem dawki dezynfektanta) ilość komórek żywych malała, co świadczy o skuteczności przeprowadzonego procesu (rysunki 10 i 11).



Rysunek 10 a-f. Analiza FCM ścieków oczyszczonych i w poszczególnych minutach ozonowania; seria 1



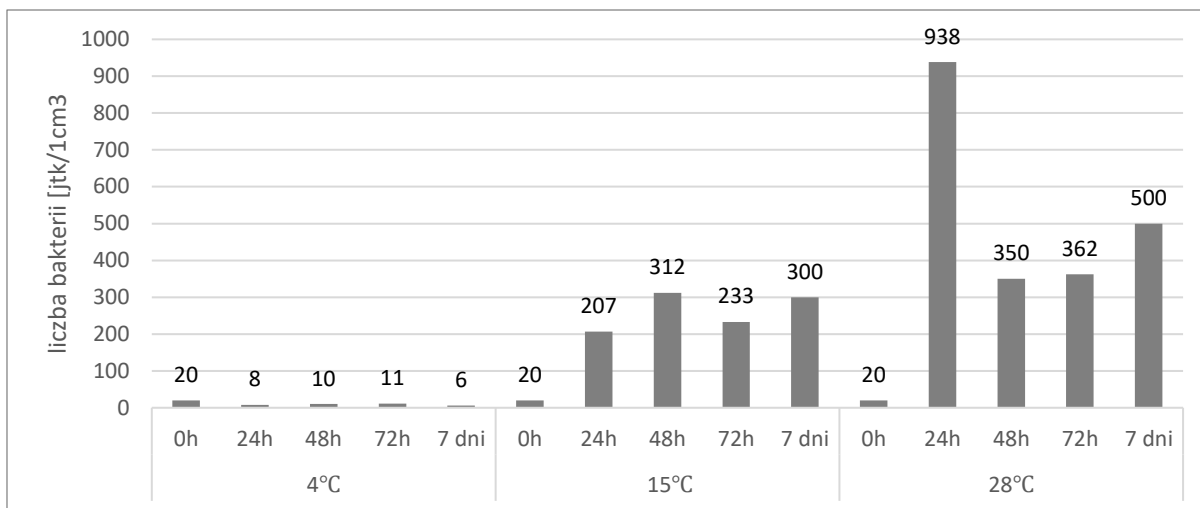


Rysunek 11 a-i. Analiza FCM ścieków oczyszczonych i w kolejnych minutach ozonowania; seria 2

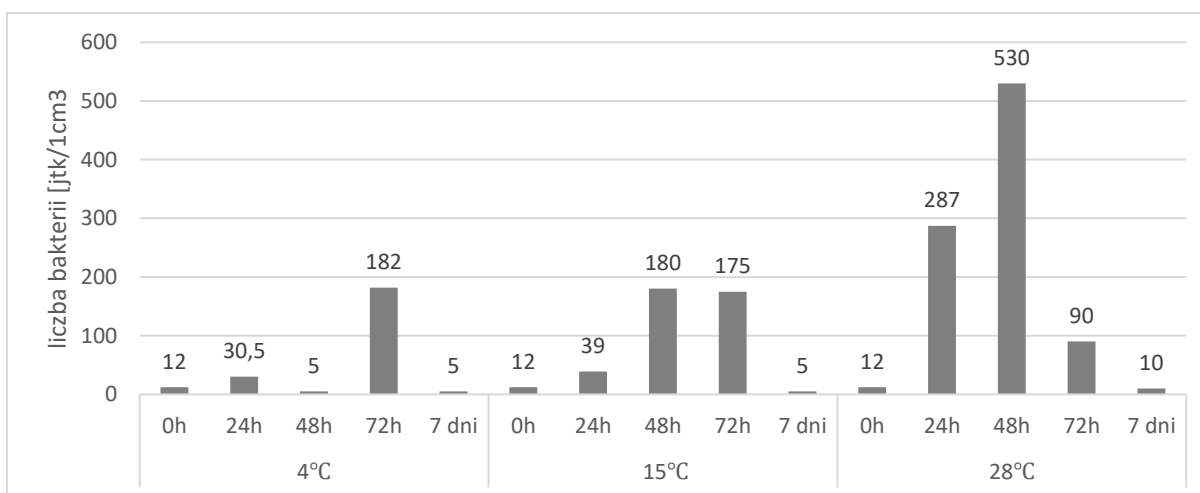
3.4.2. Wyniki badań stabilności mikrobiologicznej ścieków po procesie dezynfekcji ozonem

W pierwszej serii badań dziewięćminutowe ozonowanie ścieków pozwoliło na eliminację bakterii *coli* i *E. coli* oraz na znaczną redukcję liczebności pozostałych mikroorganizmów. Ścieki po procesie ozonowania nie charakteryzowały się jednak stabilnością mikrobiologiczną. Ponowny wzrost drobnoustrojów nastąpił już po 24h od momentu dezynfekcji.

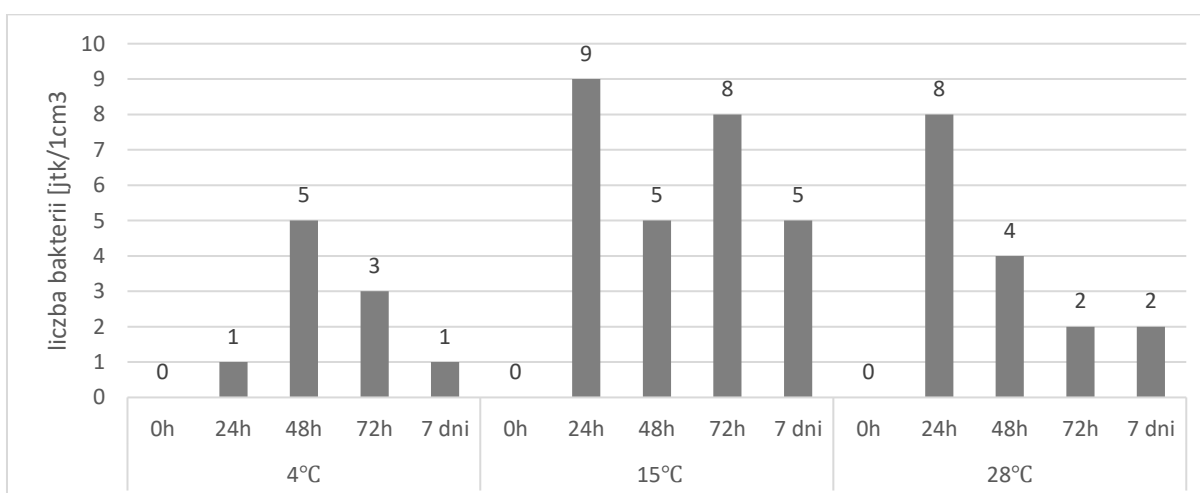
Zaobserwowano wpływ temperatury na odbudowę mikroorganizmów. W przypadku bakterii z grupy *coli* i *E. coli* (rysunek 45d-e) temperatura 4°C spowodowała zahamowanie rozwoju bakterii w próbach i utrzymanie tego efektu nawet do 7 dnia trwania eksperymentu. Zmiany w wielkości populacji bakteryjnych tworzących przetrwalniki były zbliżone dla każdego zakresu temperatur. Ich największą i najdłużej utrzymującą się liczebność odnotowano dla temperatury 15°C (rysunek 45c). Wyższe temperatury inkubacji próbek powodowały szybszą rekonstrukcję bakterii. W przypadku bakterii psychrofilnych i mezofilnych (rysunek 45a-b) największe liczebności bakterii zauważono w próbkach umieszczonych w inkubatorze w temperaturze 28°C.



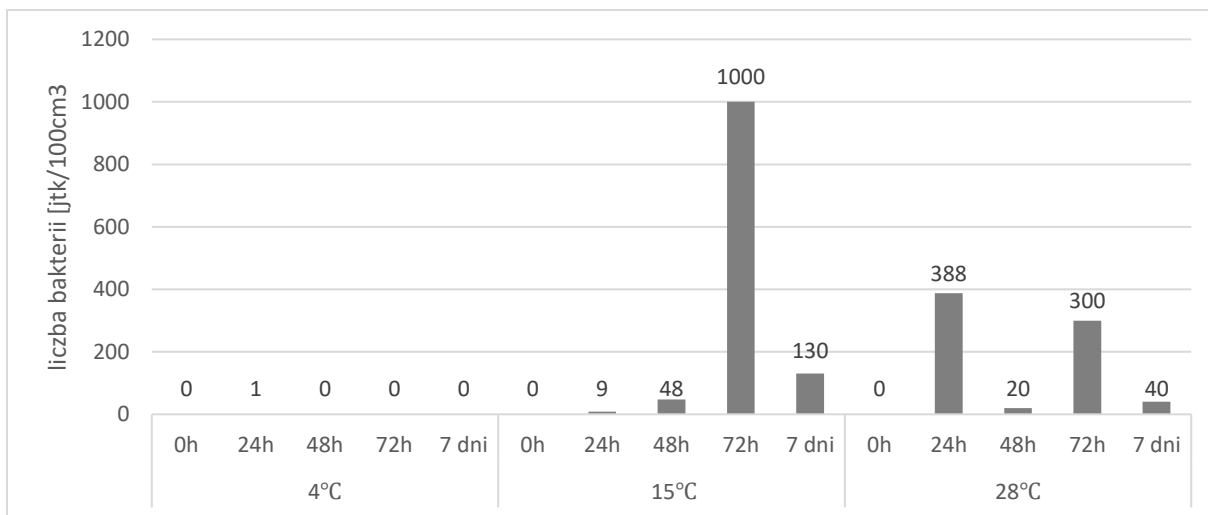
a) Zmiany liczebności bakterii psychrofilnych



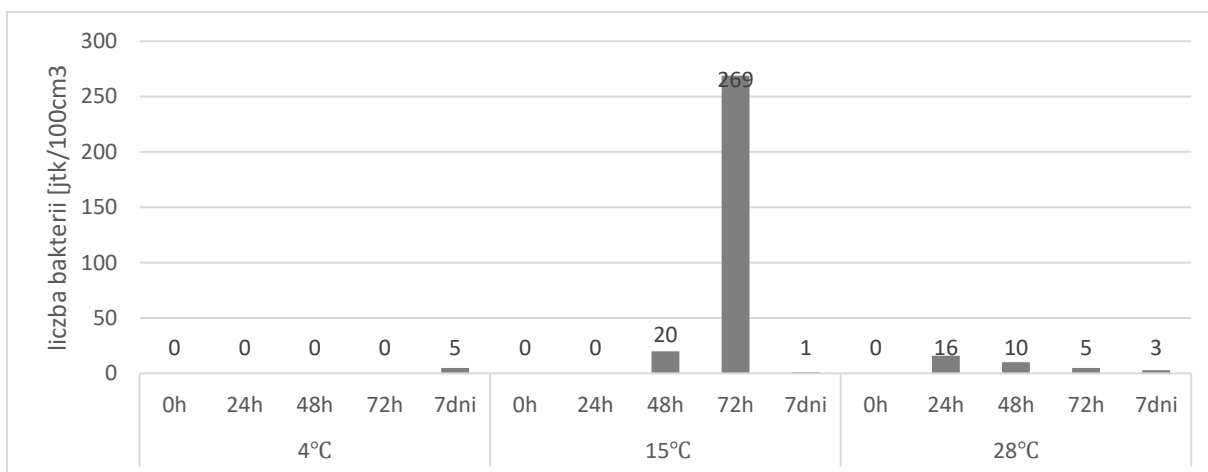
b) Zmiany liczebności bakterii mezofilnych



c) Zmiany liczebności bakterii tworzących przetrwalniki



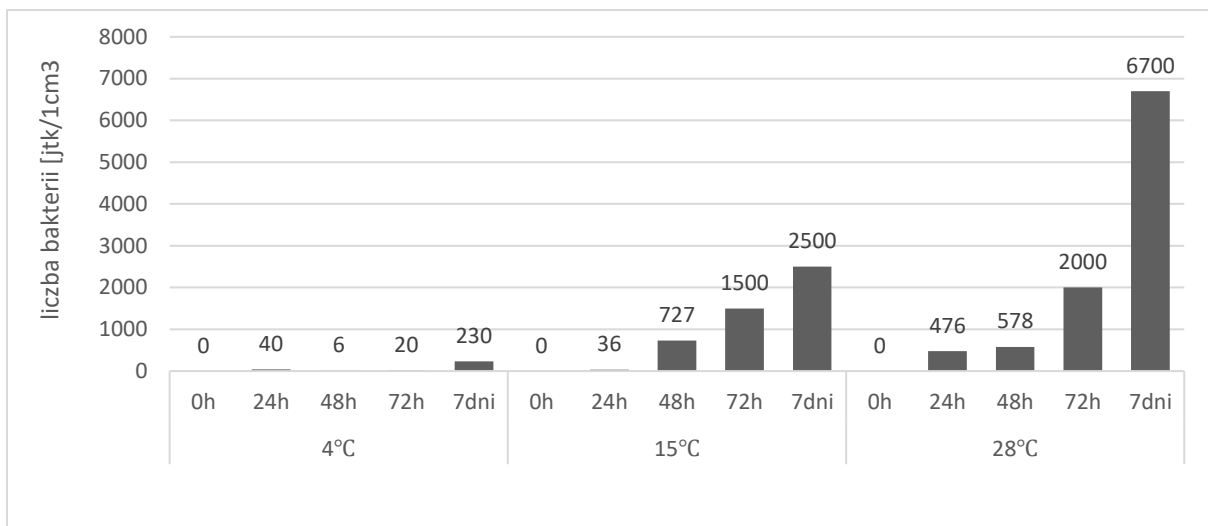
d) Zmiany liczebności bakterii z grupy *coli*



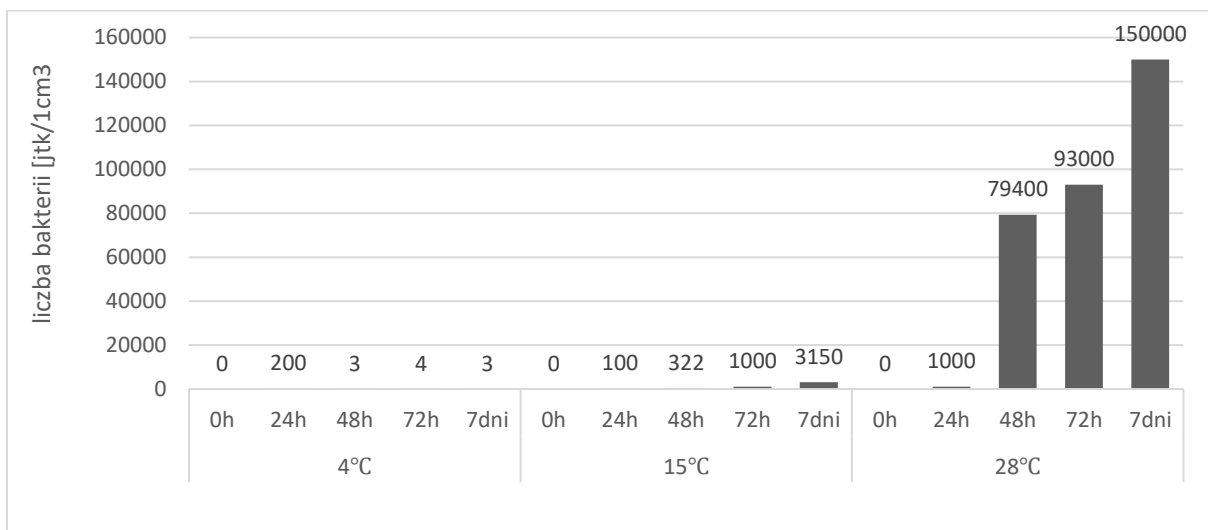
e) Zmiany liczebności bakterii *E. coli*

Wykres 45 a-e. Zmiany liczebności bakterii psychrofilnych, mezofilnych, bakterii z grupy *coli* i *E. coli* oraz form przetrwalnikowych podczas badania stabilności dla 9 minut ozonowania; załącznik 39

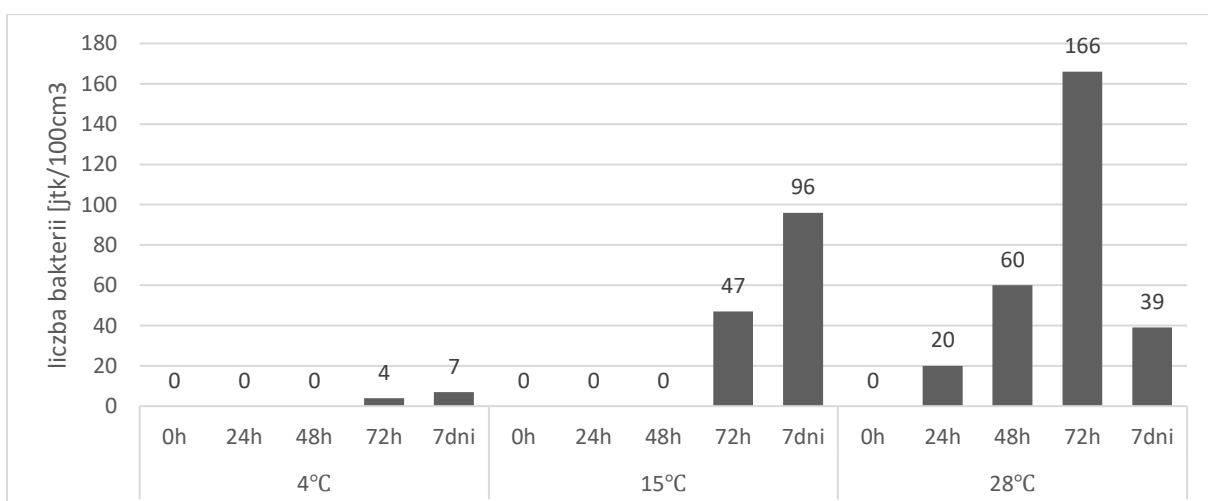
W drugiej serii badań ozonowanie ścieków przez 11 minut pozwoliło na całkowitą eliminację bakterii psychrofilnych, mezofilnych, bakterii *coli* i *E. coli* (100% redukcji). Ponownie stwierdzono jednak brak stabilności mikrobiologicznej dezynfekowanych prób. Wyniki zaprezentowane na wykresach 46a-d potwierdzają odbudowę bakterii psychrofilnych, mezofilnych, *coli* i *E. coli* w każdym badanym zakresie temperatur. W zależności od temperatury zmienia się tempo odbudowy mikroorganizmów – najwolniejszy wzrost liczebności bakterii odnotowano w temperaturze 4 i 15°C, gdzie odbudowa bakterii *coli* i *E. coli* nastąpiła dopiero około 72h od przeprowadzonej dezynfekcji. Wzrost temperatury do 28°C spowodował skrócenie czasu odbudowy i rekonstrukcje bakterii *coli* i *E. coli* już 24h po ozonowaniu. Odbudowa pozostałych bakterii (mezofilnych i psychrofilnych) nastąpiła po 24h niezależnie od temperatury.



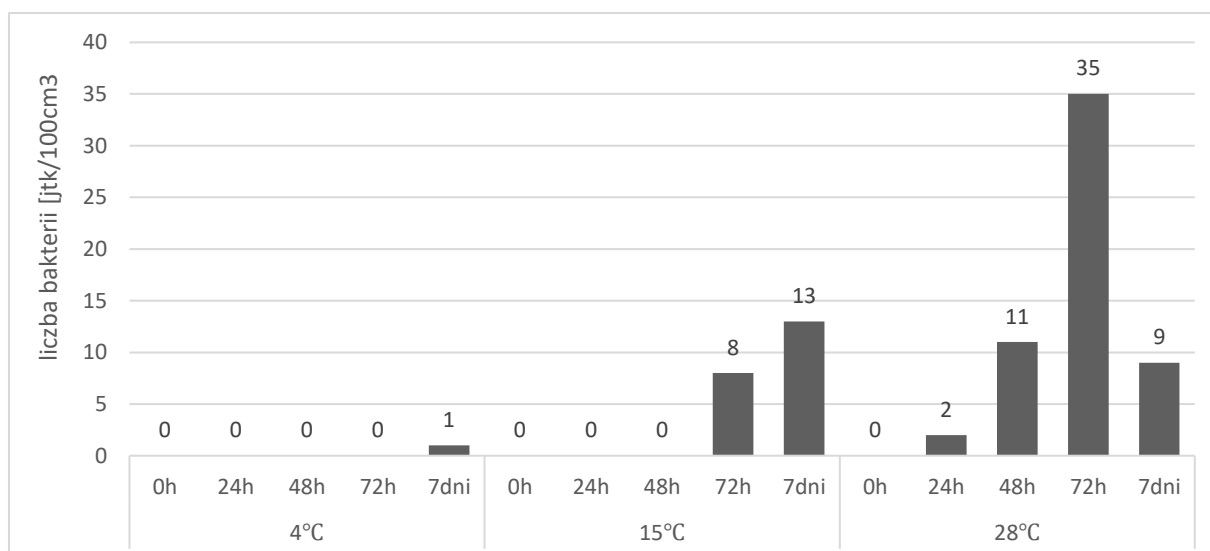
a) Zmiany liczebności bakterii psychrofilnych



b) Zmiany liczebności bakterii mezofilnych



c) Zmiany liczebności bakterii z grupy coli



d) Zmiany liczebności bakterii *E. coli*

Wykres 46 a-d. Zmiany liczebności bakterii *coli*, *E. coli*, mezofilnych i psychrofilnych podczas badania stabilności 11min; załącznik 40

Wyniki stabilności mikrobiologicznej ścieków oczyszczonych po przeprowadzonym procesie dezynfekcji ozonem zestawiono w tabelach 19 i 20.

Tabela 19. Wartości parametrów S dla czasu ozonowania 9 minut, dla poszczególnych rodzajów drobnoustrojów i wariantów inkubacji

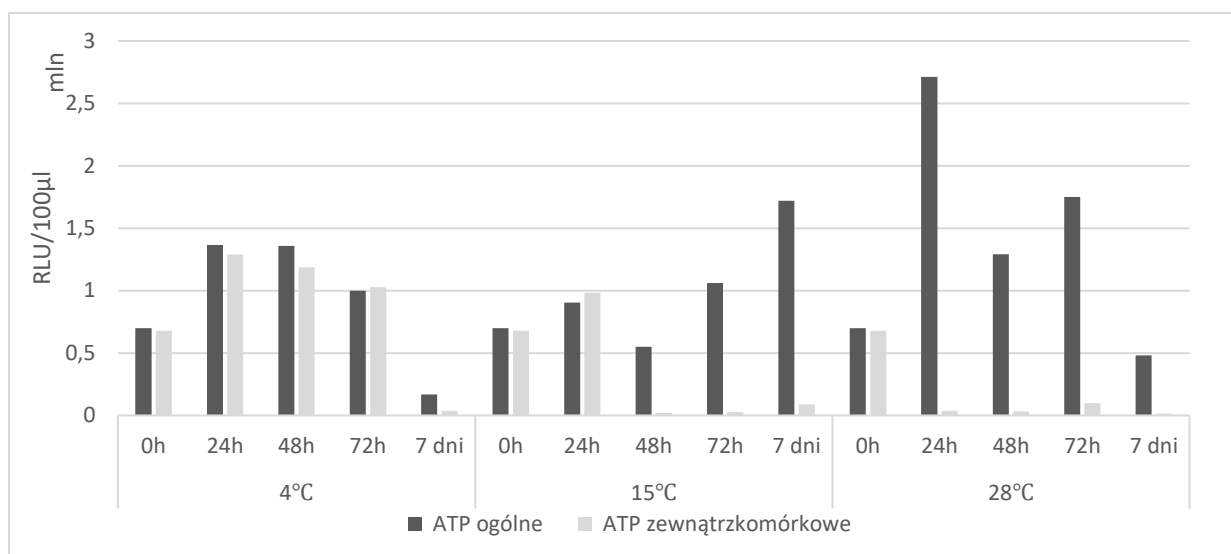
9 min	Wartość „S”				
	bakterie psychrofilne	bakterie mezofilne	formy przetrwalnikowe	bakterie <i>E. coli</i>	bakterie <i>coli</i>
4°C					
24h	8/2x10 ¹ <1	3,1x10 ¹ /1,2x10 ¹ >1	1/0 >1	0/0 <1	0/0 <1
48h	1x10 ¹ /2x10 ¹ <1	5/1,2x10 ¹ <1	5/0 >1	0/0 <1	1/0 >1
72h	1,1x10 ¹ /2x10 ¹ <1	1,82x10 ² /1,2x10 ¹ >1	3/0 >1	0/0 <1	0/0 <1
7 dni	6/2x10 ¹ <1	5/1,2x10 ¹ <1	1/0 >1	5/0 >1	0/0 <1
15°C					
24h	2,07x10 ² /2x10 ¹ >1	3,9x10 ¹ /1,2x10 ¹ >1	0/0 <1	0/0 <1	0/0 <1
48h	3,12x10 ² /2x10 ¹ >1	1,8x10 ² /1,2x10 ¹ >1	9/0 >1	0/0 <1	9/0 >1
72h	2,33x10 ² /2x10 ¹ >1	1,75x10 ² /1,2x10 ¹ >1	5/0 >1	2x10 ¹ /0 >1	4,8x10 ¹ /0 >1
7 dni	3x10 ² /2x10 ¹ >1	5/1,2x10 ¹ <1	8/0 >1	2,69x10 ² /0 >1	1x10 ³ /0 >1
28°C					
24h	9,38x10 ² /2x10 ¹ >1	2,87x10 ² /1,2x10 ¹ >1	0/0 <1	1,6x10 ¹ /0>1	3,88x10 ² /0 >1
48h	3,5x10 ² /2x10 ¹ >1	5,3x10 ² /1,2x10 ¹ >1	8/0 >1	1x10 ¹ /0 >1	2x10 ¹ /0 >1
72h	3,62x10 ² /2x10 ¹ >1	9x10 ¹ /1,2x10 ¹ >1	4/0 >1	5/0 >1	3x10 ² /0 >1
7 dni	5x10 ² /2x10 ¹ >1	1x10 ¹ /1,2x10 ¹ <1	2/0 >1	3/0 >1	4x10 ¹ /0 >1

Tabela 20. Wartości parametrów S dla czasu ozonowania 11 minut dla poszczególnych rodzajów drobnoustrojów i wariantów inkubacji

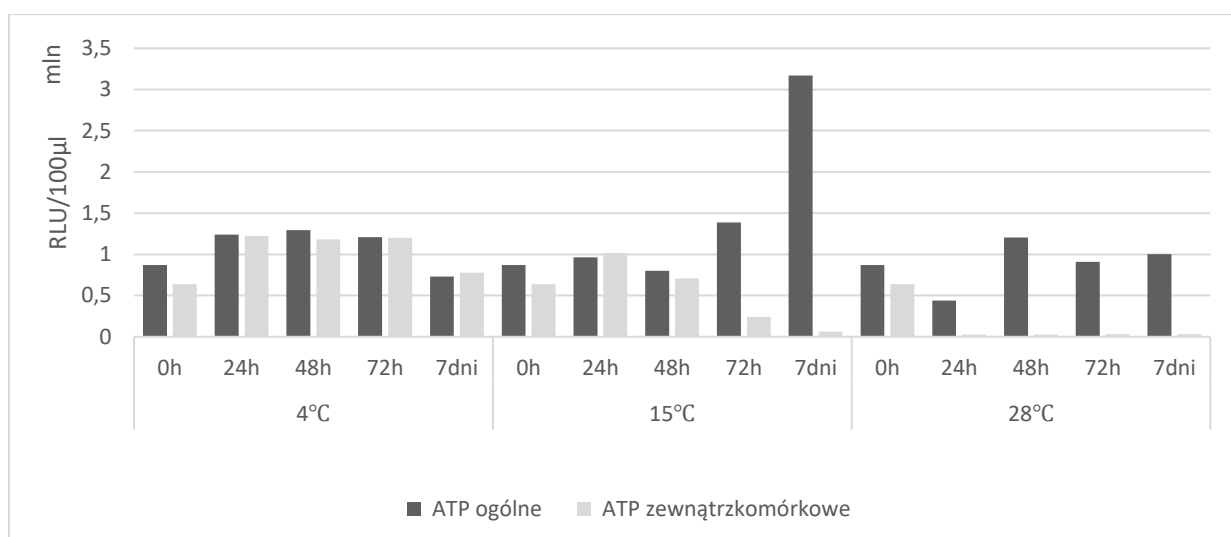
11 min	bakterie psychrofilne	bakterie mezofilne	formy przetrwalnikowe	bakterie <i>E. coli</i>	bakterie <i>coli</i>
4°C					
24h	4x10 ¹ /0 >1	2x10 ² /0 >1	-	0/0 <1	0/0 <1
48h	6/0 >1	3/0 >1	-	0/0 <1	0/0 <1
72h	2x10 ¹ /0 >1	4/0 >1	-	0/0 <1	4/0 >1
7 dni	2,3x10 ² /0 >1	3/0 >1	-	1/0 >1	7/0 >1
15°C					
24h	3,6x10 ¹ /0 >1	1x10 ² /0 >1	-	0/0 <1	0/0 <1
48h	7,27x10 ² /0 >1	3,22x10 ² /0 >1	-	0/0 <1	0/0 <1
72h	1,5x10 ³ /0 >1	1x10 ³ /0 >1	-	8/0 >1	4,7x10 ¹ /0 >1
7 dni	2,5x10 ³ /0 >1	3,15x10 ³ /0 >1	-	1,3x10 ¹ /0 >1	9,6x10 ¹ /0 >1
28°C					
24h	4,76x10 ² /0 >1	1x10 ³ /0 >1	-	2/0 >1	2x10 ² /0 >1
48h	5,78x10 ² /0 >1	7,94x10 ⁴ /0 >1	-	1,1x10 ¹ /0 >1	6x10 ³ /0 >1
72h	2x10 ³ /0 >1	9,3x10 ⁴ /0 >1	-	3,5x10 ¹ /0 >1	1,66x10 ² /0 >1
7 dni	6,7x10 ³ /0 >1	1,5x10 ⁵ /0 >1	-	9/0 >1	3,9x10 ¹ /0 >1

Najlepszy wynik uzyskano dla bakterii *E. coli* w próbach inkubowanych w temperaturze 4°C. Warunki te pozwoliły na utrzymanie efektu dezynfekcji do 72h. Pozytywne wyniki zaobserwowano również w przypadku bakterii *coli*. Na uwagę zasługuje utrzymanie stabilności mikrobiologicznej po ozonowaniu dla bakterii psychrofilnych, inkubowanych w temperaturze 4°C. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że ozonowanie ścieków przez 9 minut nie pozwoliło na całkowite usunięcie bakterii psychrofilnych ze ścieków (po zastosowanym procesie dezynfekcji ich liczebność w dalszym ciągu wynosiła 2x10¹ jtk/100cm³).

Zmiany wartości RLU w badaniu stabilności mikrobiologicznej ścieków po procesie dezynfekcji ozonem potwierdziły przywrócenie biocenozy drobnoustrojów w inkubowanych próbkach ścieków. Najszybsza odbudowa bakterii (wzrost ATP ogólnego, przy braku lub niskich wartościach ATP zewnątrzkomórkowego) nastąpiła w temperaturze 28°C (wykresy 47 i 48).

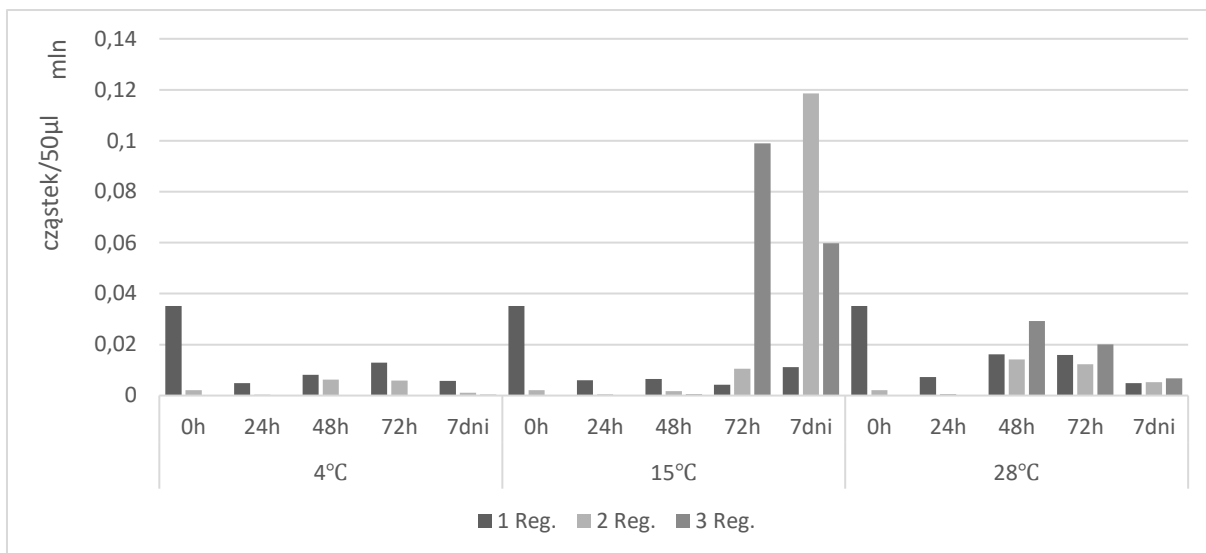


Wykres 47. Zmiany wartości RLU ścieków po ozonowaniu; wariant 1; badanie w temperaturach 4, 15 i 28°C; załącznik 41

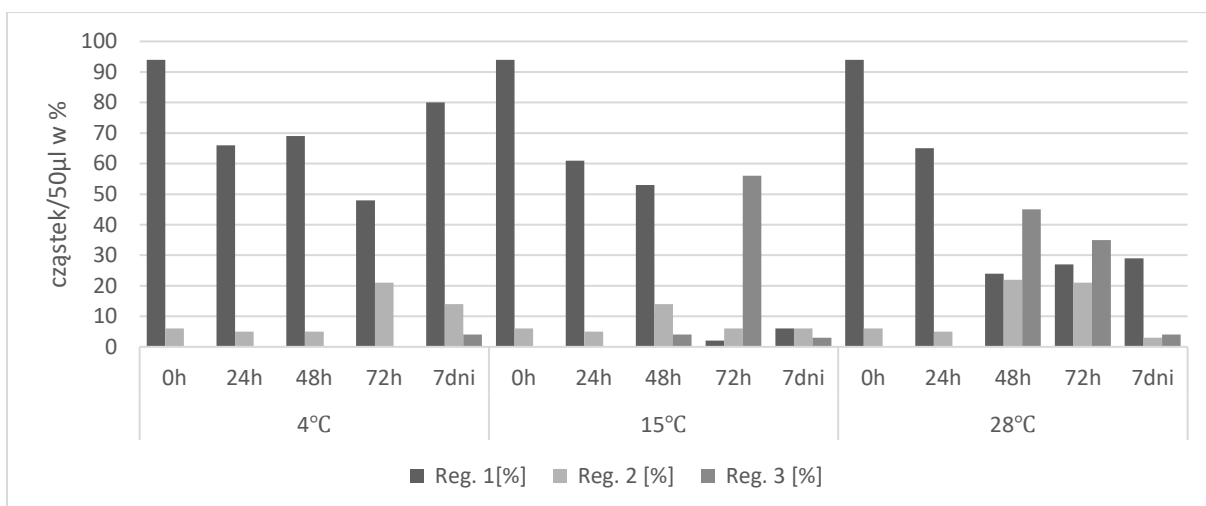


Wykres 48. Zmiany wartości RLU ścieków po ozonowaniu; wariant 2; badanie w temperaturach 4, 15 i 28°C; załącznik 42

Wyniki analizy cytometrycznej przedstawiono na wykresach 49a-b oraz na rysunku 12. Na podstawie poniższych danych można stwierdzić, że w próbce inkubowanej w temperaturze 15°C wraz z czasem trwania eksperymentu (72h i 7 dni) rosła liczebność populacji w każdym regionie, przede wszystkim regionie 2 i 3, odpowiadającym populacjom mikroorganizmów uszkodzonych i żywych. W próbce inkubowanej w temperaturze 28°C liczebność kolejnych populacji jest niższa, jednak ich wzrost w każdym regionie odnotowano wcześniej, już w 48h.

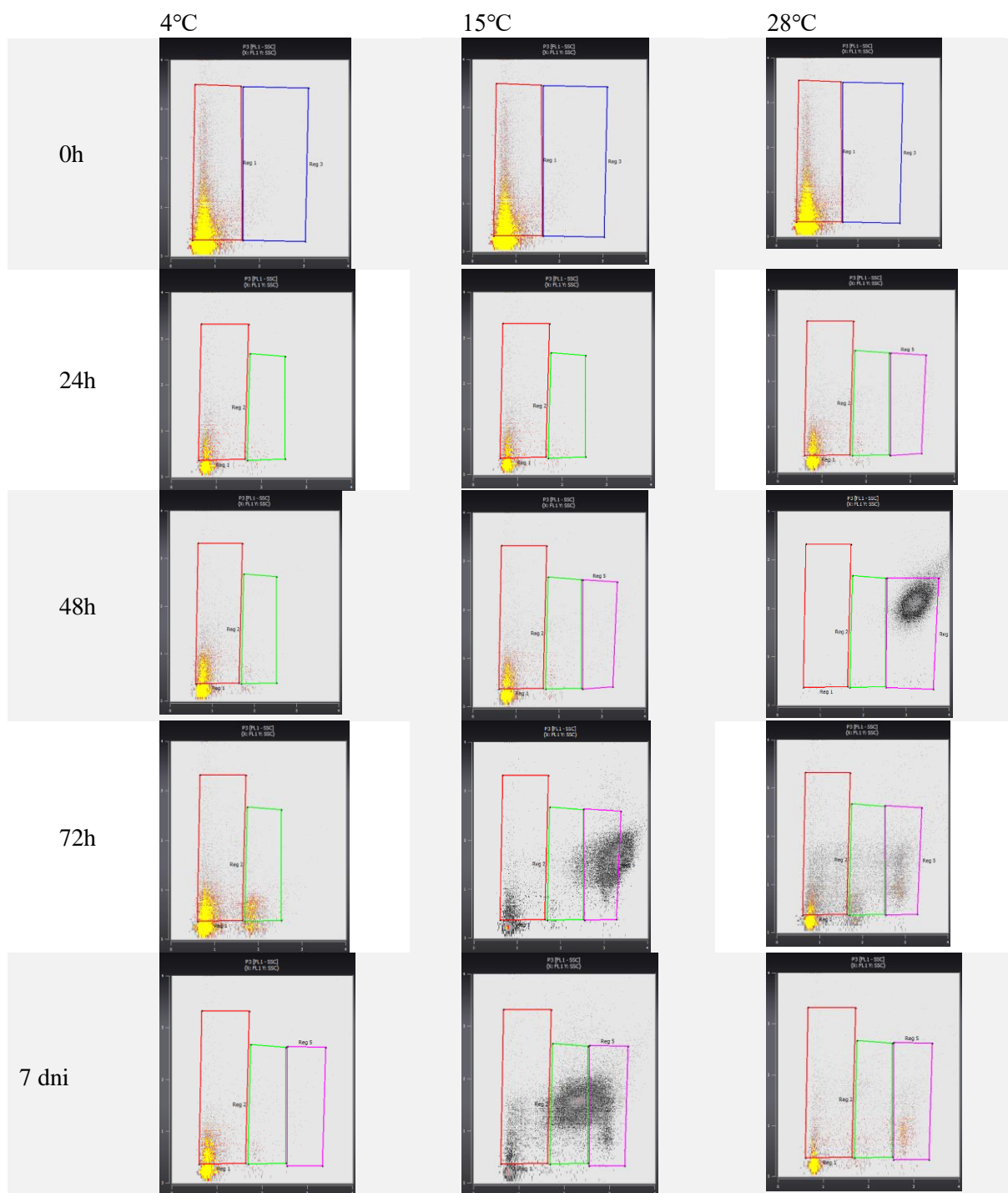


a) Analiza FCM



b) Udział procentowy poszczególnych regionów

Wykres 49 a-b. Analiza FCM w stabilności mikrobiologicznej ścieków dezynfekowanych ozonem; załącznik 43



Rysunek 12. Zmiana populacji bakteryjnej w zależności od czasu i temperatury

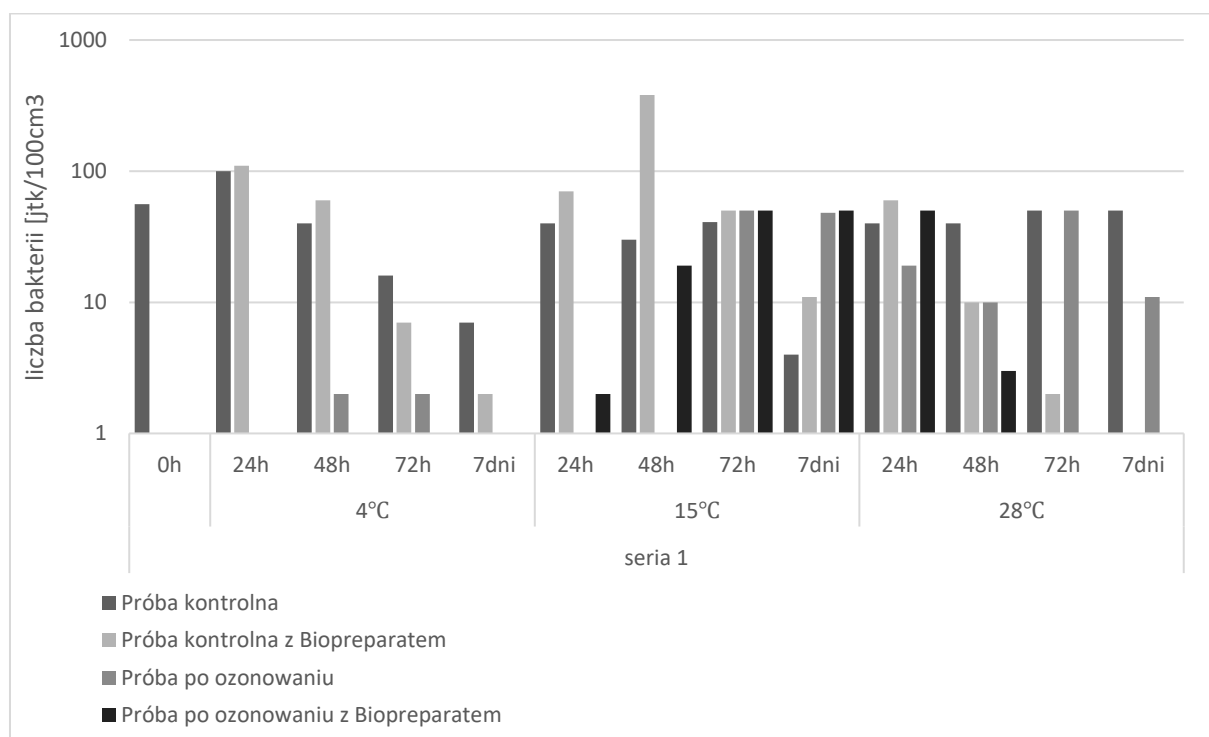
3.4.3. Określenie wpływu biopreparatu A7 na jakość mikrobiologiczną ścieków po procesach dezynfekcji ozonem

Po przeprowadzeniu dezynfekcji ozonem w próbach nie wykryto bakterii *coli* (0 jtk/cm^3). Badania przeprowadzone w konfiguracji z biopreparatem aplikowanym w formie płynnej wykazały wyższe liczebności bakterii *coli* w ściekach w porównaniu z próbkami z dodatkiem

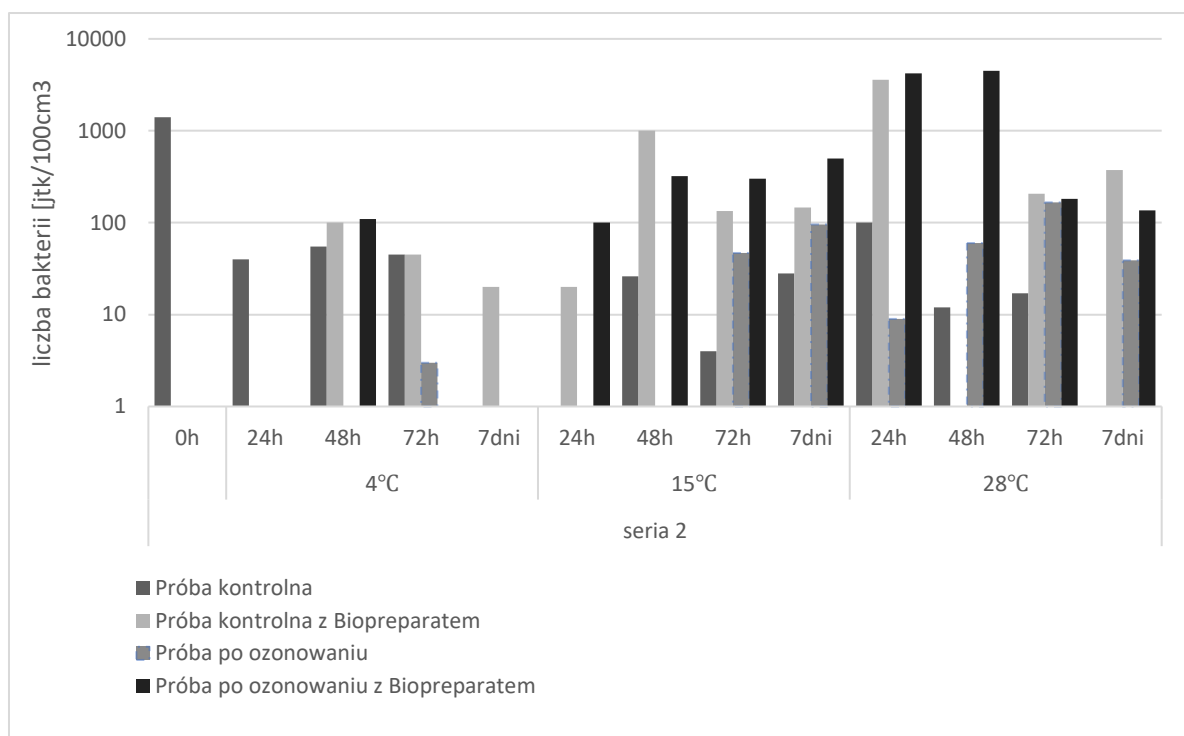
wyzolowanych z biopreparatu mikroorganizmów. W najwyższej temperaturze 28°C liczebność bakterii *coli* w ozonowanych próbach z dodatkiem biopreparatu w formie płynnej wynosiła nawet $1,52 \times 10^6$ jtk/100cm³ (załącznik 44).

W drugiej konfiguracji do prób dodano bakterie z biopreparatu, oddzielone od bulionu odżywczego, na którym zostały namnożone. Po 24-godzinnej inkubacji w próbach po dezynfekcji ozonem z dodatkiem bakterii z biopreparatu liczebność bakterii *coli* wynosiła kolejno: 0; 2 i 5×10^1 jtk/100cm³ dla temperatur 4, 15 i 28°C w serii 1 oraz 0; 1×10^2 i $4,2 \times 10^3$ jtk/100cm³ w serii 2. W próbach po dezynfekcji ozonem, bez dodania bakterii biopreparatu, po 24h inkubacji, liczebność bakterii *coli* wynosiła kolejno: 0; 1 i $1,9 \times 10^1$ dla temperatur 4, 15 i 28°C w serii 1 oraz 0 i 9 jtk/100cm³ w serii 2. Bakterie z biopreparatu wykazały zatem właściwości stymulujące rozwój bakterii *coli* w ściekach. Po 24-godzinnej inkubacji prób we wszystkich zastosowanych temperaturach wykorzystany w badaniu biopreparat wpłynął na wzrost liczebności bakterii *coli*.

Dodanie bakterii z biopreparatu do ozonowanych ścieków miało znikomy wpływ na liczebność mikroorganizmów w próbach umieszczonych w temperaturze 4°C. W pozostałych temperaturach biopreparat przyspieszył odbudowę bakterii *coli* – rekonstrukcja nastąpiła już w 24h. Liczebność bakterii *coli* w próbie kontrolnej (ściekach oczyszczonych) malała systematycznie wraz z czasem trwania eksperymentu. W wyższych temperaturach dodatek bakterii z biopreparatu do ścieków oczyszczonych wpłynął stymulująco na wzrost bakterii (wykres 50a-b).



a) Seria 1 – ozonowanie 9 minut

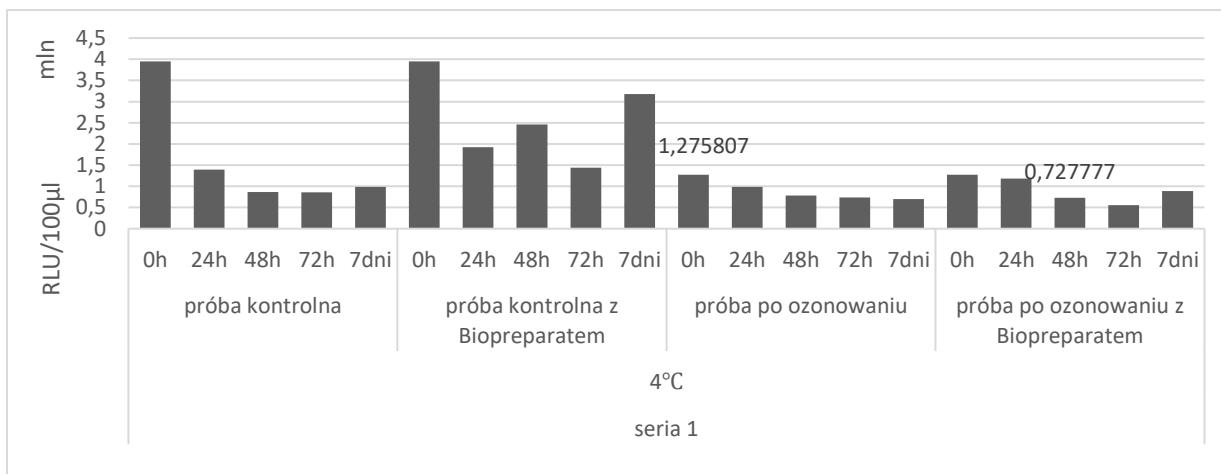


b) Seria 2 – ozonowanie 11 minut

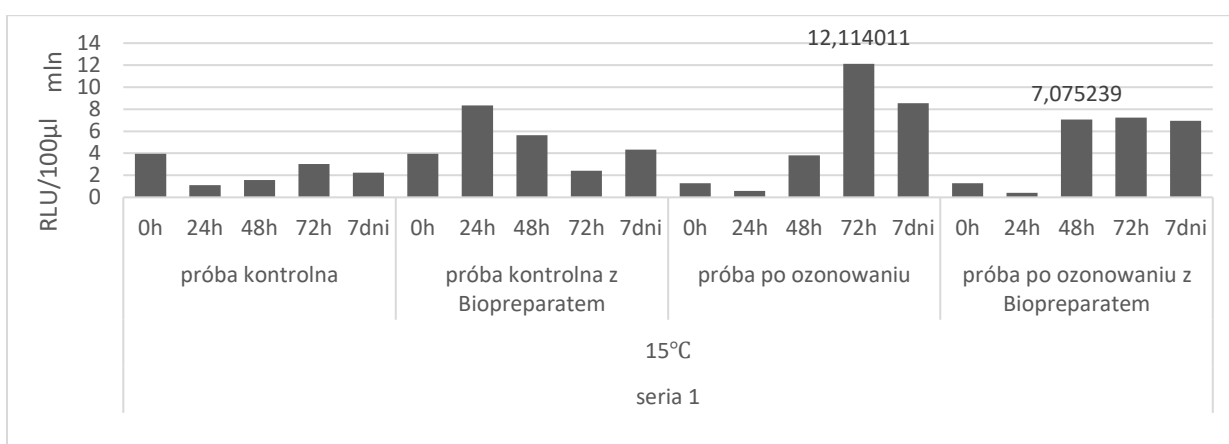
Wykres 50 a-b. Liczba bakterii *coli* w próbie kontrolnej (ściekach oczyszczonych) i po ozonowaniu oraz z dodatkiem biopreparatu w skali logarytmicznej; załącznik 44

Przeprowadzona analiza luminometryczna, potwierdziła wpływ temperatury na odbudowę mikroorganizmów w próbach po ozonowaniu. W ściekach oczyszczonych, stanowiących próbę kontrolną, początkowa wartość RLU wynosiła około 4 mln RLU/100 μ . W temperaturze 4°C wraz z czasem trwania eksperymentu wartość RLU malała. W 7 dniu eksperymentu wynosiła mniej niż 1 mln RLU/100 μ . Wzrost temperatury spowodował zaburzenia tej tendencji. Wartość RLU w 48h badania, w temp. 28°C była wyższa niż w dniu rozpoczęcia eksperymentu. W każdej badanej temperaturze, końcowa wartość ATP była jednak znacząco niższa od wartości początkowej, co w związku z kończącym się pożywieniem jest charakterystyczne dla hodowli stałych. W próbach po ozonowaniu, inkubowanych w temperaturze 4°C, wartość RLU wynosiła około 1 mln RLU/100 μ 24h po ozonowaniu i utrzymywała się, z lekką tendencją spadkową, do 7 dnia eksperymentu. Wyższe temperatury pozwoliły na intensywniejszy wzrost i odbudowę mikroorganizmów (wartość RLU wynosiła ponad 12 mln RLU/100 μ l).

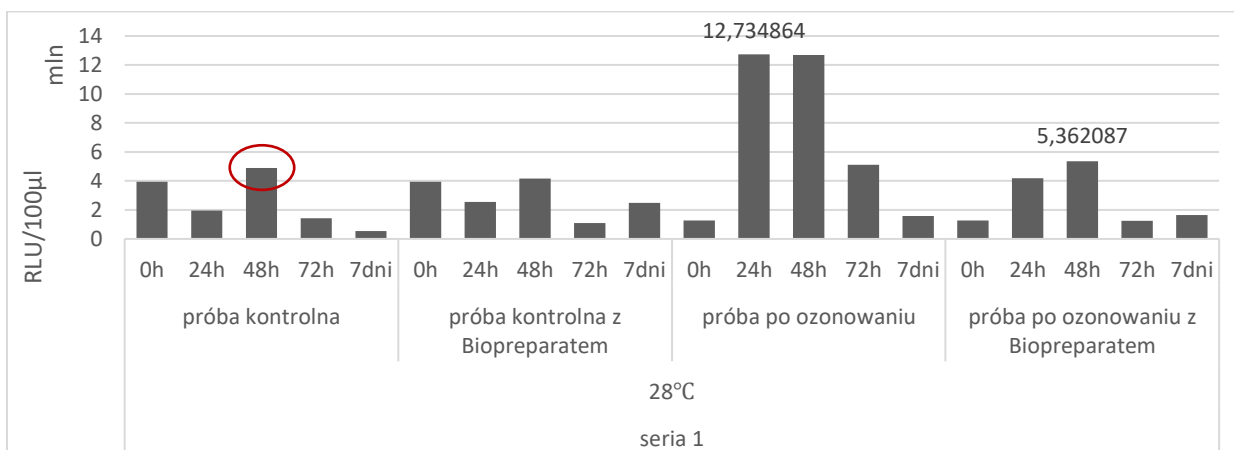
Dodanie biopreparatu do ozonowanych ścieków skutkowało niższymi wartościami RLU w próbach inkubowanych w temp. 4°C – niecały milion RLU/100 μ l po 48h od inkubacji. Dla porównania w temperaturach 15 i 28°C wartości RLU wynosiły kolejno: ponad 7 mln i ponad 5 mln RLU/100 μ l (wykres 51a-c).



a) 4°C; seria 1



b) 15°C; seria 1

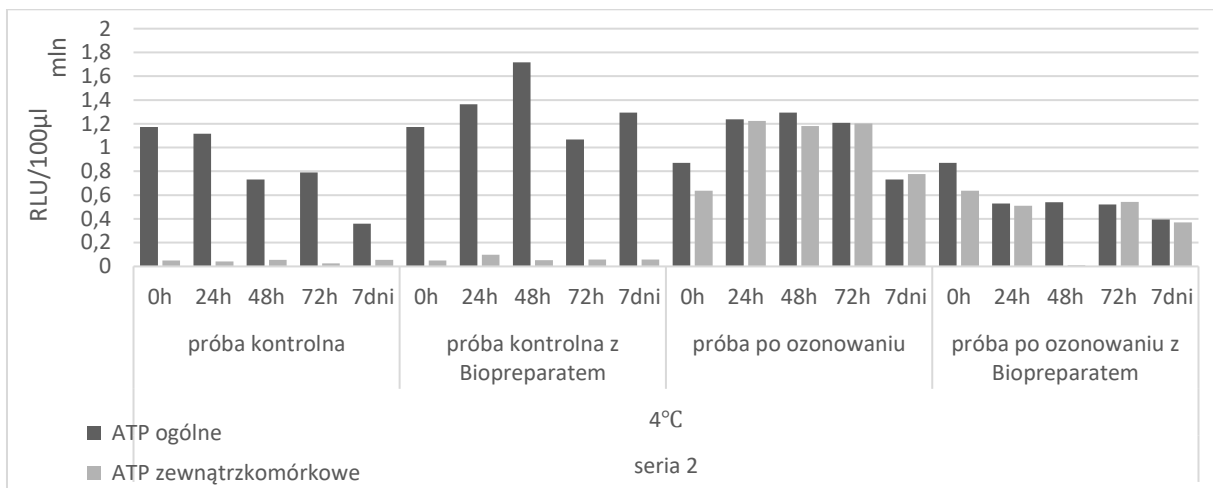


c) 28°C; seria 1

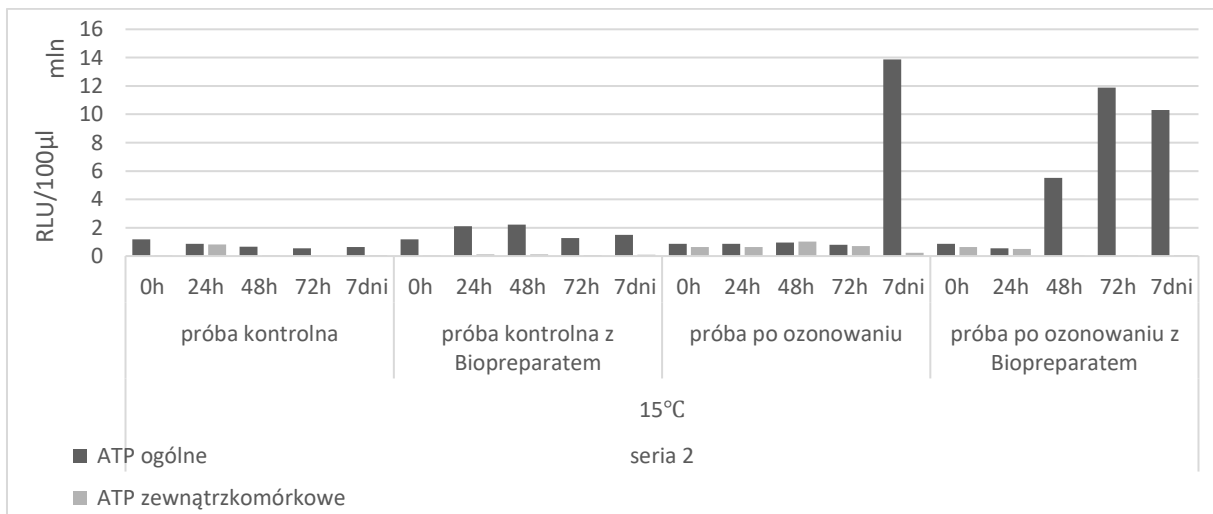
Wykres 51 a-c. Zmiany wartości RLU. ATP ogólne, seria1, temp 4,15 i 28°C; załącznik 45

W drugiej serii badań analizę luminometryczną rozszerzono o badanie ATP zewnątrzkomórkowego. Pozwoliło to na szybkie potwierdzenie skuteczności działania procesu dezynfekcji przy zastosowanej dawce ozonu. W porównaniu z próbą kontrolną próba po

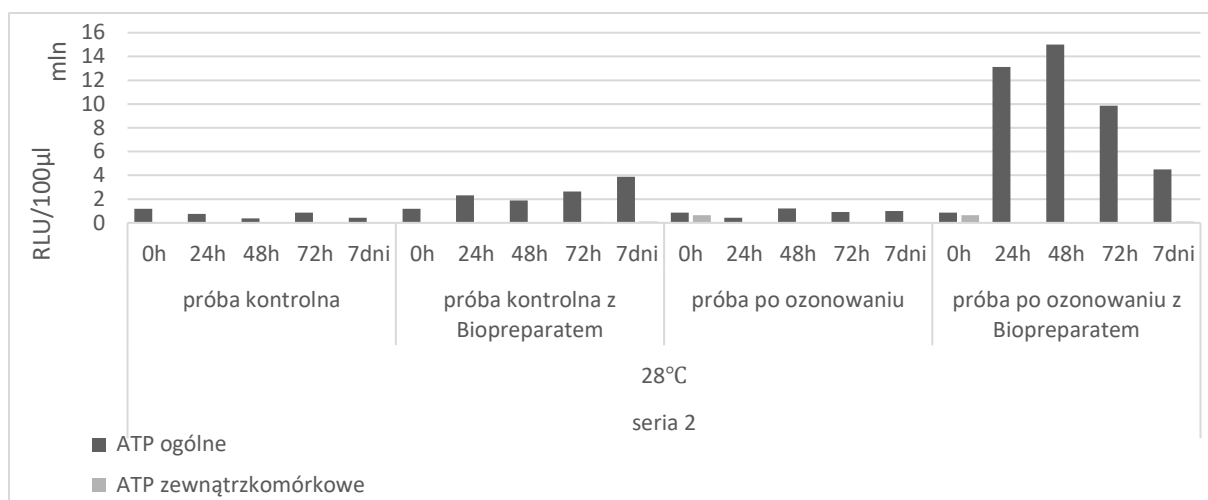
ozonowaniu charakteryzowała się wysoką zawartością ATP zewnątrzkomórkowego, co świadczy o uszkodzeniu komórek mikroorganizmów, a tym samym zdezynfekowaniu ścieków. Ponadto można zaobserwować wpływ temperatury na asymilację mikroorganizmów pochodzących z biopreparatów (im wyższa temperatura, tym większy wzrost wartości ATP ogólnego – próba po ozonowaniu z biopreparatem w temp. 15 i 28°C) (wykresy 52a-c).



a) 4°C; seria 2



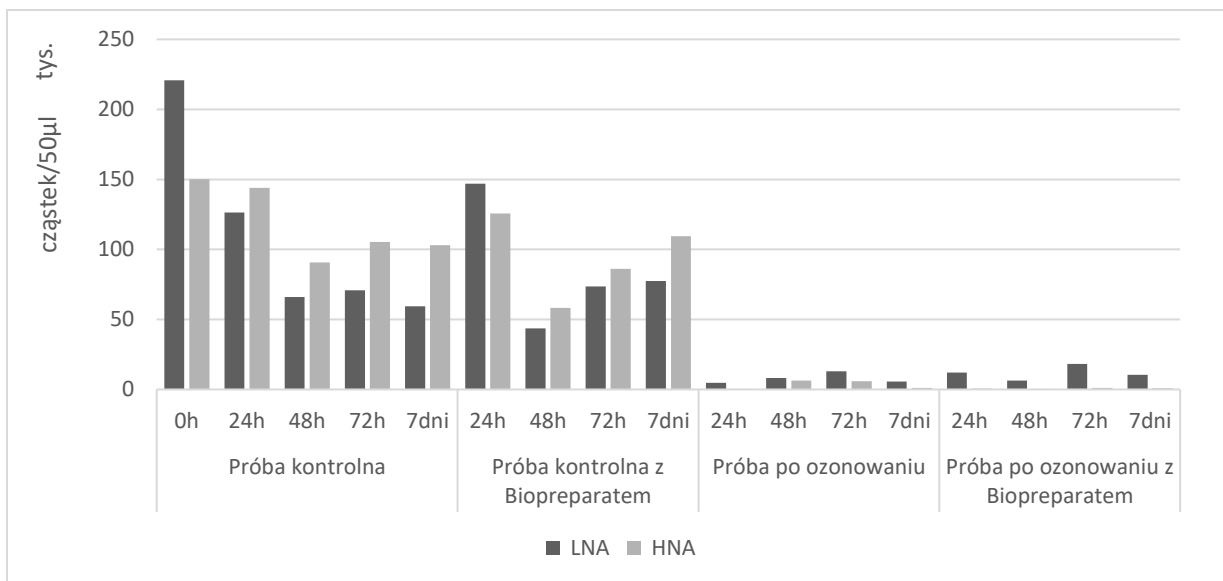
b) 15°C; seria 2



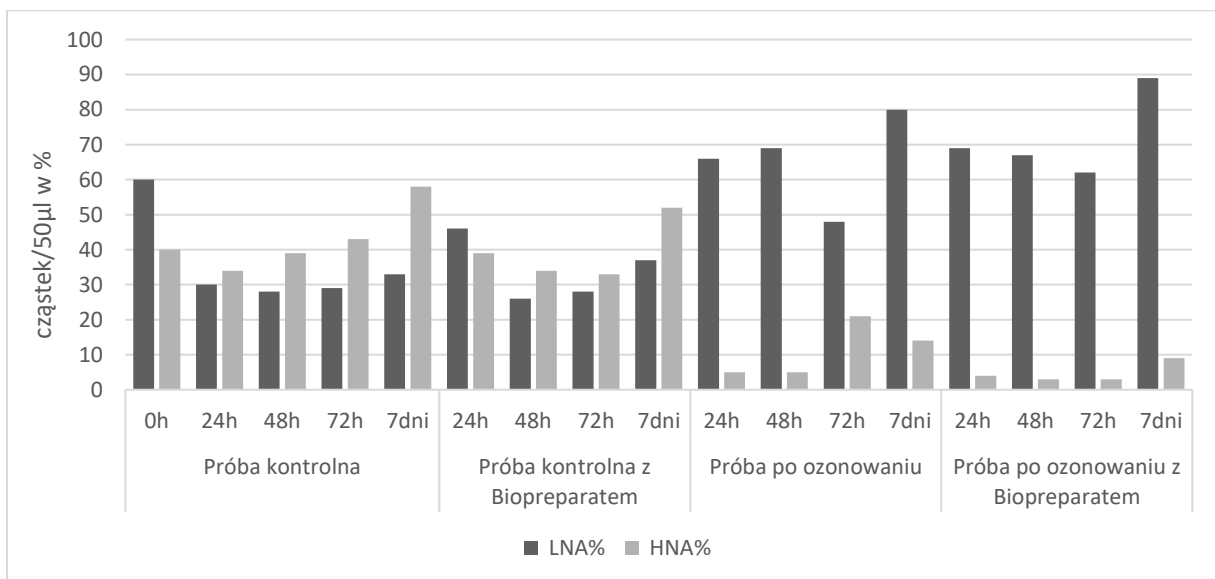
c) 28°C; seria 2

Wykres 52 a-c. Zmiany wartości RLU. ATP ogólne i zewnątrzkomórkowe, seria2, temp 4,15 i 28°C; załącznik 45

Analiza cytometryczna FCM pozwoliła na szybkie określenie skuteczności przeprowadzonych procesów dezynfekcji. Na wykresie 53a można dostrzec różnice w ilości cząstek populacji bakteryjnych w ściekach oczyszczonych (próba kontrolna) wynoszące średnio 120 tys. cząstek na 50µl i w ściekach zdezynfekowanych (próba po ozonowaniu) wynoszących około 10 tys. cząstek na 50µl. Na wykresie 53b przedstawiono procentowy stosunek populacji komórek martwych (LNA) do ilości komórek żywych (HNA). Można zauważyć, że w ściekach oczyszczonych wartości te są porównywalne. Dezynfekcja ścieków spowodowała natomiast niemal 6-krotną przewagę komórek martwych (LNA) nad komórkami żywymi (HNA). Wpływ biopreparatu w próbie kontrolnej na rozwój mikroorganizmów w temp. 4°C jest minimalny, z uwagi na niską temperaturę, a tym samym niesprzyjające dla mikroorganizmów warunki do wzrostu (rysunek 13).

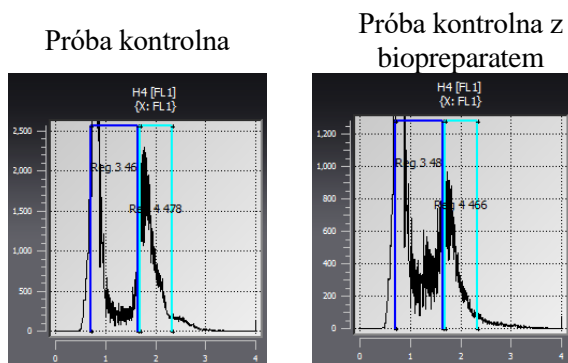


a) Analiza FCM



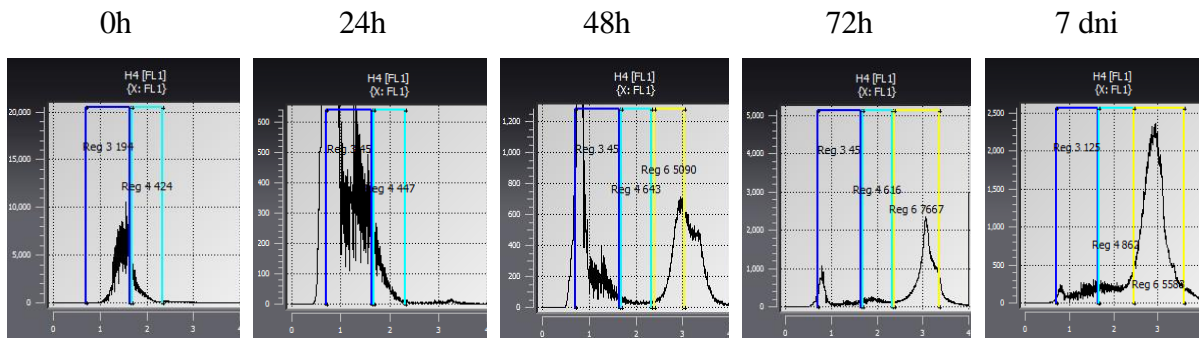
b) Udział procentowy frakcji LNA i HNA

Wykres 53. Analiza FCM. Próby po ozonowaniu i z dodatkiem biopreparatu inkubowane w temperaturze 4 °C; załącznik 46

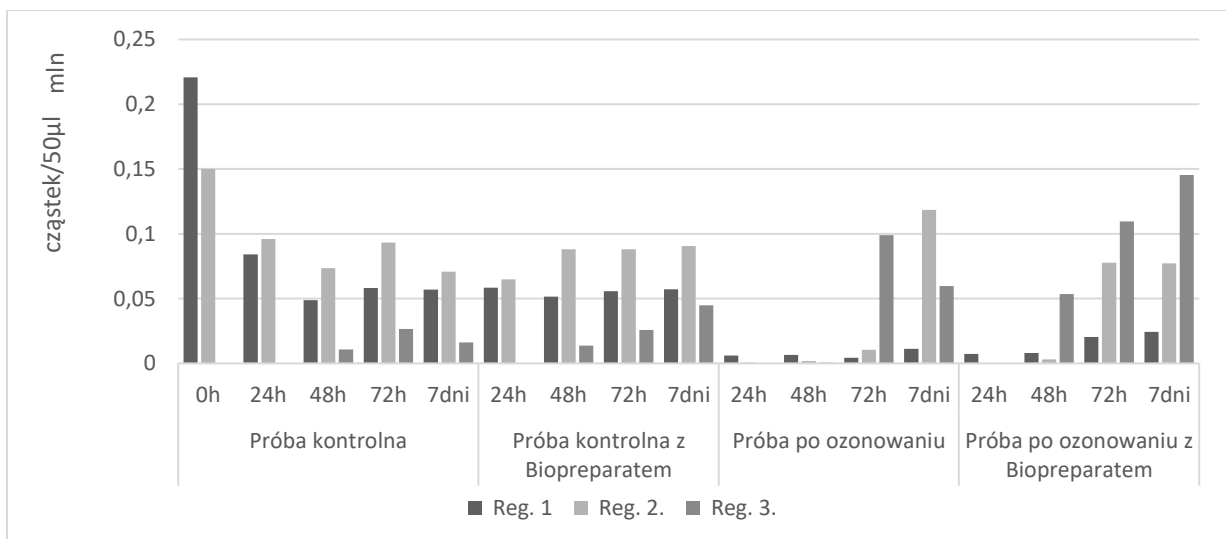


Rysunek 13. Analiza FCM. Wpływ biopreparatu na rozwój mikroorganizmów w temp. 4°C po upływie 24h

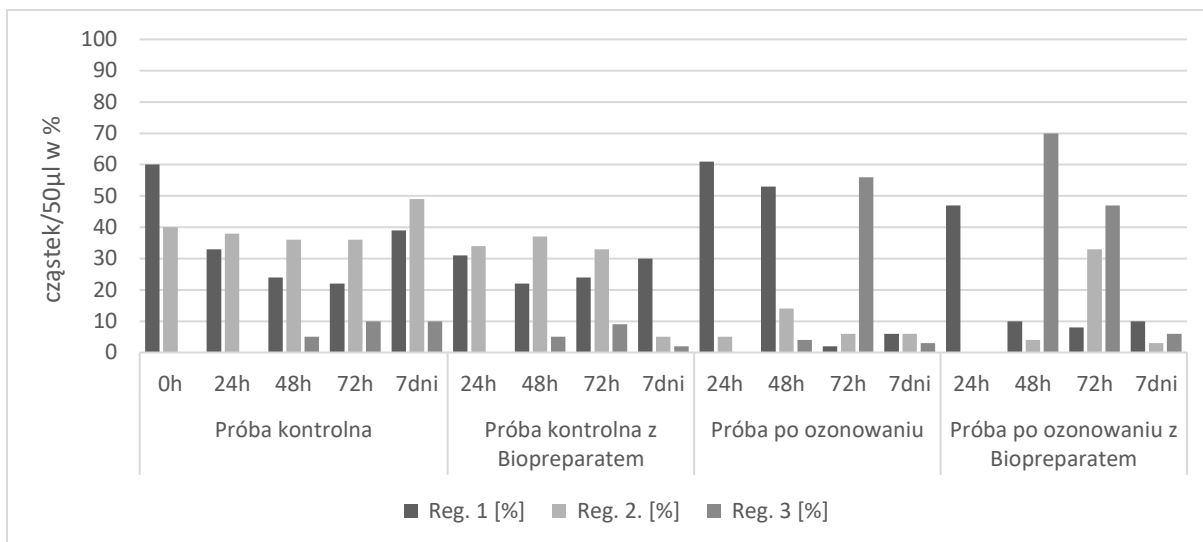
Wzrost temperatury do 15°C spowodował wydzielenie się w połowie czasu trwania eksperymentu 3 regionu populacji. W próbie kontrolnej 3 region mogą stanowić żywe bakterie ciepłolubne. Może o tym świadczyć fakt, że czas inkubacji około 48h w temperaturze 15°C jest charakterystyczny dla rozwoju niektórych grup bakteryjnych (rysunek 14).



Rysunek 14. Analiza FCM. Wpływ czasu na rozwój mikroorganizmów z biopreparatu w próbie po ozonowaniu, na przykładzie próby z biopreparatem umieszczonej w ciepłarnie w temp. 15°C



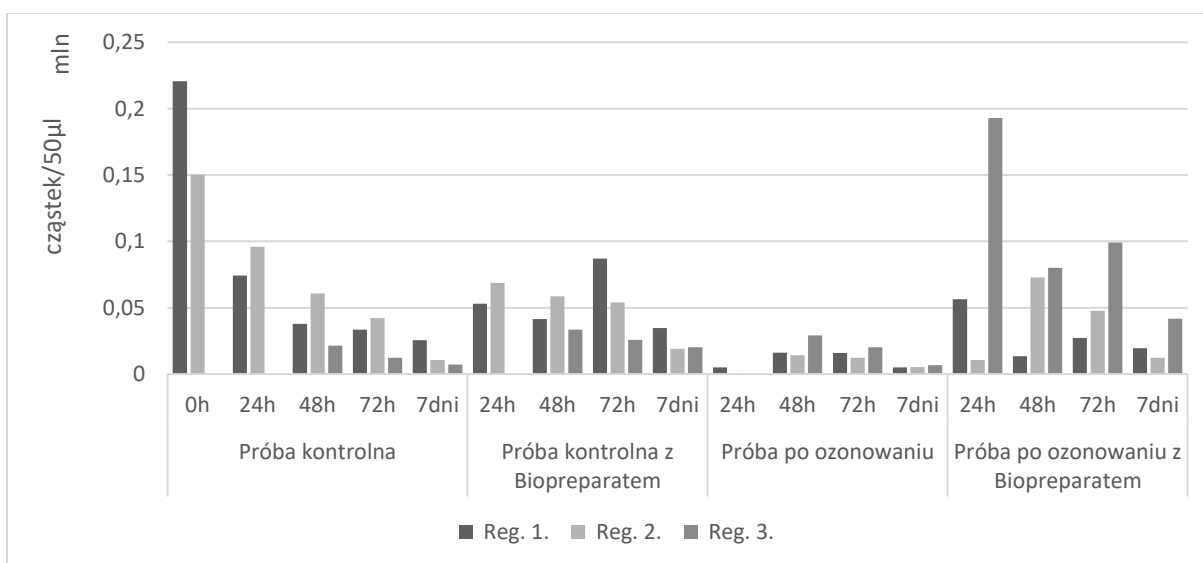
a) Analiza FCM



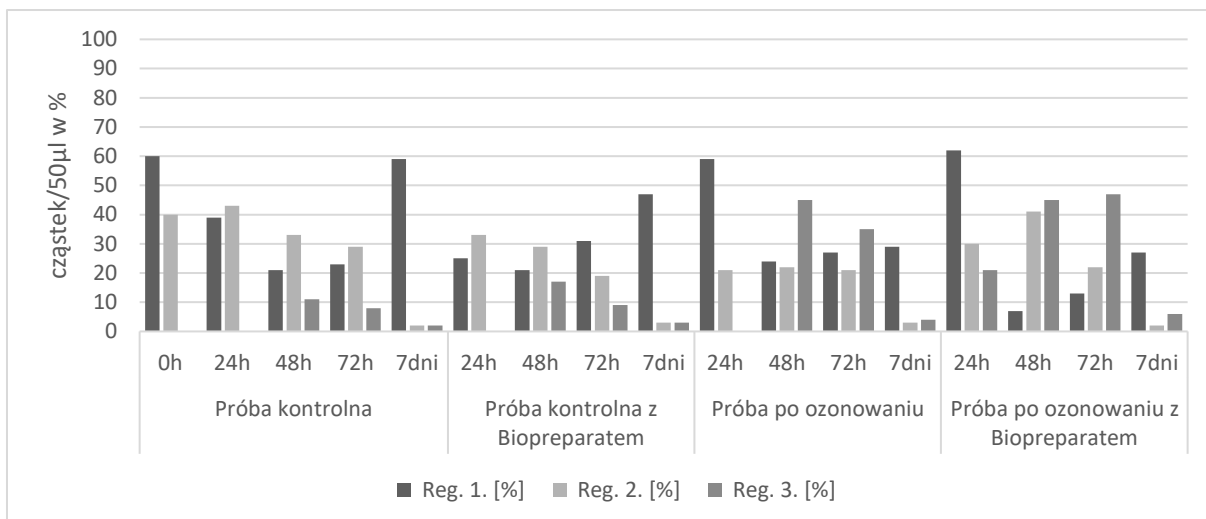
b) Udział procentowy

Wykres 54 a-b. Analiza FCM. Próby po ozonowaniu i z dodatkiem biopreparatu inkubowane w temperaturze 15°C; załącznik 46

W próbach po dezynfekcji ozonem zauważono zjawisko odbudowy mikroflory. Regeneracja następuje średnio w 48h od ozonowania (zaobserwowano wpływ temperatury na tempo odbudowy). W próbach po ozonowaniu inkubowanych w temperaturze 15°C odnotowano wydzielenie się regionu 3 w 72h. Dodanie biopreparatu do ozonowanych ścieków spowodowało dodatkowy wzrost populacji regionu 2 i 3 już od 48h eksperymentu (wykres 54a-b). Wzrost temperatury do 28°C spowodował skrócenie tego czasu i wydzielenie się regionu 3 już w 48h od ozonowania. Wzrost temperatury spowodował również dalszy wzrost liczebności populacji regionu 2 i 3 w ozonowanych próbach z dodatkiem biopreparatu. Wzrost ten następuje już w 24h badania (wykres 55a-b).



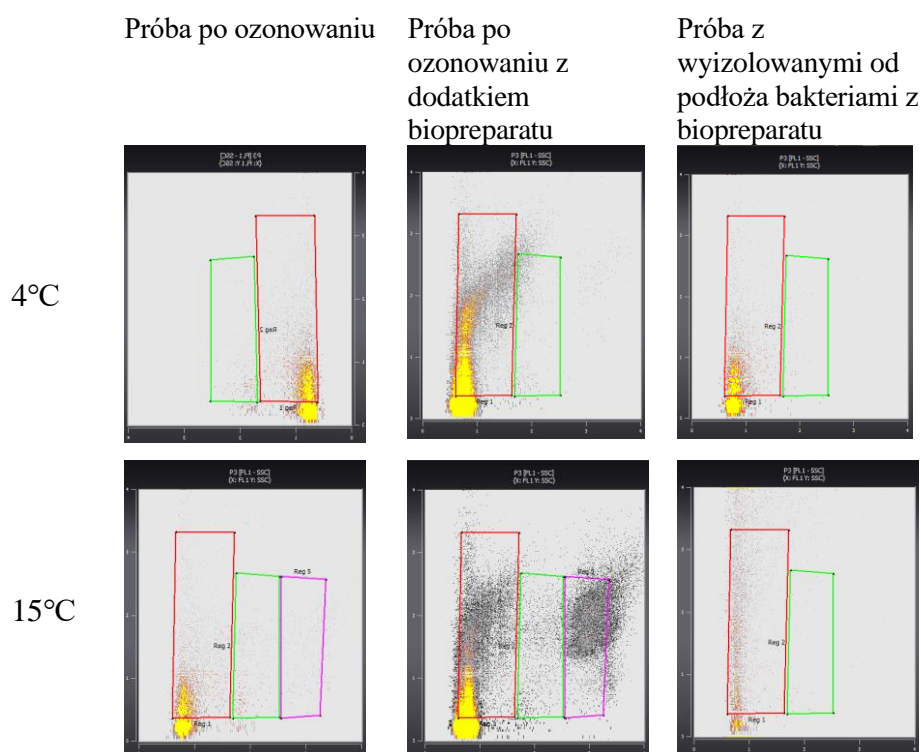
a) Analiza FCM



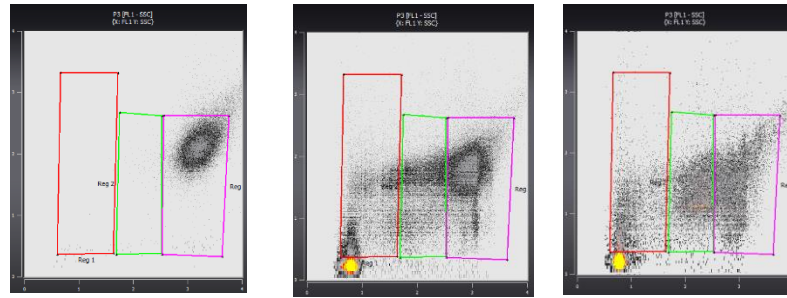
b) Udział procentowy

Wykres 55 a-b. Analiza FCM w [%]. Próby po ozonowaniu i z dodatkiem biopreparatu inkubowane w temperaturze 28°C; załącznik 46

Wzrost temperatury powoduje przyspieszenie odbudowy mikroorganizmów, przez co procentowy udział komórek martwych (LNA), żywych (HNA) i bakterii z populacji regionu 3 ulega zrównaniu (rysunek 15).



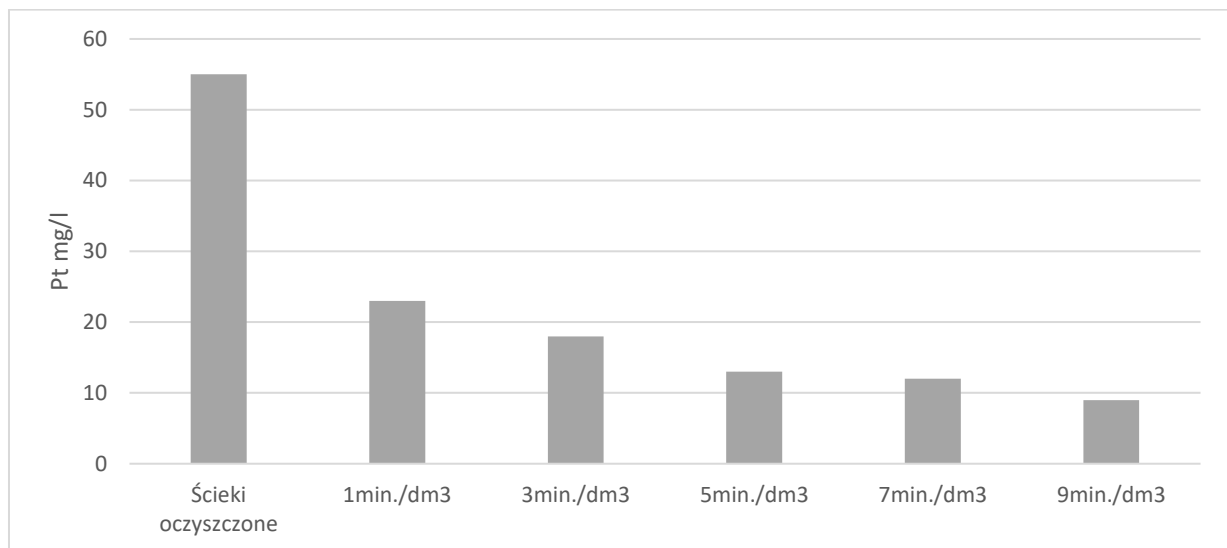
28°C



Rysunek 15. Analiza FCM. Wpływ temperatury na rozwój biopreparatów w próbach, przykład po upływie 48h

3.4.4. Wpływ ozonu na barwę ścieków

Stwierdzono wpływ czasu kontaktu z ozonem na barwę ścieków. Im dłuższy czas kontaktu, tym większa redukcja ich koloru (wykres 56).



Wykres 56. Wpływ długości/dawek ozonowania na barwę ścieków; załącznik 47

3.4.5. Dyskusja

Do najczęściej stosowanych chemicznych metod oczyszczania ścieków należy chlorowanie, cenione ze względu na skuteczność i niski koszt. Jednakże ze względu na tworzące się produkty ubocznych dezynfekcji (DBP) metoda ta może mieć niekorzystny wpływ na zdrowie publiczne i życie wodne, powodując m.in. śmierć ryb w zbiornikach wodnych, do których odprowadza się ścieki dezynfekowane chlorem. Z tego powodu amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (US EPA) zachęcała do badań nad alternatywnymi metodami dezynfekcji, takimi jak ozonowanie, które okazało się bardzo skuteczne w oczyszczaniu ścieków [253].

Dezynfekujące właściwości ozonu związane są z tzw. lizą komórek. Bakterie ulegają rozkładowi w wyniku degradacji ściany komórkowej spowodowanej utlenianiem protoplazmy. Podwójne wiązania w lipidach pozwalają ozonowi działać jako środek dezynfekujący, powodując zwiększoną przepuszczalność ścian i błon komórkowych poprzez ozonolizę [178]. Kiedy cząsteczka rozpada się w miejscu podwójnego wiązania między atomami węgla, rozpada się na krótsze łańcuchy, zabijając bakterie szybciej, niż zrobiłby to chlor. Co zaskakujące, w lipidach tworzących błonę komórkową znajduje się około 10^6 wiązań podwójnych [231,444]. Używanie O_3 do dezynfekcji może zakłócić funkcjonowanie błony komórkowej bakterii, enzymów i relacji między nimi w komórce bakteryjnej. Wykazano, że na skuteczność inaktywacji bakterii wpływa skład (wielkość, kształt czy skład błony komórkowej) oraz stan fizjologiczny zbiorowiska bakteryjnego [269]. Należy pamiętać, że sam rodzaj mikroorganizmu i jego budowa mogą mieć tutaj kluczowe znaczenie. Ściana komórkowa stanowi naturalną barierę ochronną przed wnikaniem obcych substancji. Ozon wnika do komórki bakteryjnej dopiero po jej uprzednim uszkodzeniu. W wyniku przenikania ozonu przez ścianę komórkową zachodzi reakcja, w wyniku której uwalniają się białka, powstają nadtlenki kwasów tłuszczowych i zmienia się przepuszczalność ściany komórkowej. Do czasu całkowitej penetracji ściany zewnętrznej dostęp ozonu do protoplazmy komórki i bezpośrednia reakcja utleniacza ze składnikami wewnątrzkomórkowymi są utrudnione. W rezultacie można wnioskować, że śmierć komórki bakteryjnej jest uzależniona od wyniku uszkodzenia jej zewnętrznej warstwy [445]. Dodatkowo, jak zauważa Dodd [446], skuteczność ozonowania może być uzależniona od rodzaju organizmu: bakterie odporne na antybiotyki mają przewagę w radzeniu sobie ze stresorami oksydacyjnymi, takimi jak ozon, w porównaniu z bakteriami, które nie są odporne na antybiotyki. Pomimo powszechnego stosowania ozonu jako środka dezynfekującego (działa na bakterie i inne organizmy) dokładny mechanizm jego działania nie

został jeszcze ustalony. Wiemy, że ozon ma znaczący wpływ na metabolizm komórkowy poprzez utlenianie koenzymów NADH i NADPH, które odgrywają ważną rolę w różnorodnych reakcjach syntezy i degradacji, takich jak oddychanie i synteza kwasów tłuszczowych. Wpływ ten zależy m.in. od szczepu bakterii, ponieważ bakterie Gram-ujemne mają słabszą wrażliwość na ozon niż bakterie Gram-dodatnie. Jeśli chodzi o dezynfekcję wirusową, rozważa się atak oksydacyjny na białka ochronne pokryte ozonem; interakcje z kwasem dezoksyrybonukleinowym lub kwasem rybonukleinowym również mogą być ważnym czynnikiem do rozważenia [447,448,449].

Przedstawione w pracy wyniki wskazują, że czas kontaktu ścieków z ozonem – 9 minut – nie był wystarczający do całkowitego wyeliminowania mikroorganizmów. Możliwe jest, że w warunkach eksperymentalnych stężenie gazu nie osiągnęło poziomu wystarczającego do całkowitej eliminacji *E. coli*, zgodnie z badaniami przeprowadzonymi przez Heß i in. [450], którzy sugerują, że odporność mikroorganizmów na inaktywację przez ozon może zależeć od kilku czynników [451]. Ozon w wodzie ulega samoistnemu rozpadowi, którego szybkość zależy od pH. Według danych literaturowych stabilność ozonu w wodzie maleje wraz ze wzrostem pH [266] (im wyższe pH, tym większe prawdopodobieństwo, że ozonowanie będzie przebiegać z zaawansowanym procesem utleniania [AOP] ze względu na wyższe stężenie rodników HO). Ponadto brak całkowitego usunięcia mikroorganizmów ze ścieków może wynikać z faktu, że mikroorganizmy występowały w skupiskach lub były chronione przez inne cząstki obecne w ściekach. Inaktywacja mikroorganizmów związana z ozonowaniem może być również uzależniona od wilgotności względnej, czasu kontaktu, zmętnienia, obecności substancji organicznych, szybkości reakcji ozonu lub produktów jego rozpadu ze związkami znajdującymi się w osadach ściekowych, zapotrzebowania na ozon czy temperatury (wpływa na rozpuszczalność, stabilność i reaktywność ozonu [262,263]. Wytwarzanie pigmentu i biofilmu również może wpływać na wrażliwość na ozon [452,453,454].

Na podstawie przeprowadzonych w pracy analiz stwierdzono, że dawka $11 \text{ mg/dm}^3 \text{ O}_3$ była skuteczna w eliminacji bakterii z grupy *coli*, natomiast dawka $13 \text{ mg/dm}^3 \text{ O}_3$ okazała się być dawką optymalną do redukcji bakterii psychrofilnych, mezofilnych, bakterii *coli* i *E. coli* na poziomie redukcji wynoszącym 100%. Literatura wskazuje, że ozon wykazuje działanie silnie destrukcyjne wobec wszystkich mikroorganizmów, które mogą potencjalnie występować w ściekach, w tym: cząstek wirusów czy cyst/oocyst pierwotniaków. Jak zauważa Bergel, proces inaktywacji mikroorganizmów zachodzi gwałtownie już przy stężeniach ozonu wynoszących około 13 mg/dm^3 , co pokrywa się z zaprezentowanymi w pracy wynikami. Już przy stężeniach resztkowych (1 mg/dm^3 i niższych) ozon inaktywuje mikroorganizmy odporne

na chlorowanie, takie jak wirus polio typu 3 czy cysty pierwotniaków *Cryptosporidium* i *Giardia* [455,456]. Dawki ozonu dla ścieków oczyszczonych biologicznie szacuje się w przedziale od 15 do 30 mg O₃/dm³, a czas kontaktu ścieków z ozonem wynosi około 15–20 minut [87]. Z badań wynika, że dawki ozonu niezbędne do zapewnienia zalecanych wartości enterokoków i bakterii *E. coli* potrzebnych do inaktywacji 97–99% patogenów wynosi odpowiednio więcej niż 5,5 mg/dm³ O₃ i nie mniej niż 4,7 mg/dm³ O₃ [457]. Inne badania potwierdzają, że w przypadku ścieków oczyszczonych dawka ozonu gazowego potrzebna do inaktywacji 97–99% patogenów wynosi około 5 mg/dm³ [458]. Zaprezentowane w pracy wyniki badań potwierdzają dane literaturowe: już dawka ozonu wynosząca 6 mg/dm³ (kontakt dezynfektanta ze ściekami trwający 5 minut) spowodował redukcję mikroorganizmów w przedziale od 96 do 99% w zależności od rodzaju bakterii. Jak zauważają Quant i in., zastosowanie ozonowania powoduje zmniejszenie całkowitej liczby i biomasy komórek bakteryjnych. Po zastosowaniu dawki powyżej 7 mg/dm³ O₃ redukcja wyniosła ponad 70%. Stwierdzono, że ozon w dawce powyżej 7 mg/dm³ powoduje niszczenie zwłaszcza mniejszych komórek. Ozonowanie skutecznie niszczy także wiroplankton. Badania donoszą o 99,9% redukcji cząstek wirusowych [457].

Podobnie jak w przypadku dezynfekcji promieniowaniem UV, również w badaniach nad ozonem stwierdzono odbudowę mikroorganizmów i brak stabilności mikrobiologicznej prób. Zjawisko ponownego wzrostu bakterii po dezynfekcji UV i ozonem w próbach można wytłumaczyć obecnością składników odżywczych w oczyszczonych ściekach. Literatura wskazuje, że dla większości mikroorganizmów określono ilościowy procent eliminacji bakterii jako bardzo wysoki (99,9% dla bakterii z grupy *coli*, *Streptococcus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *colifagi*). Niższe wartości procentowe uzyskano dla mikroorganizmów opornych: *Clostridium*, *Staphylococcus aureus*, nicieni czy grzybów chorobotwórczych. Procent eliminacji był nieco wyższy w przypadku ozonowania niż przy działaniu UV. Ozon okazał się być nieznacznie skuteczniejszy w eliminowaniu *Salmonelli* niż promieniowanie UV, ale różnica była minimalna. Poprawę wydajności ozonu w porównaniu do dezynfekcji promieniami UV można wytłumaczyć faktem, że niszczy on komórkę, podczas gdy promieniowanie UV działa zapobiegawczo, hamując replikację komórkowego materiału genetycznego. Ten sam mechanizm może stanowić wyjaśnienie na etapie ponownego wzrostu mikroorganizmów odpowiedzialnego za brak stabilności mikrobiologicznej ścieków po procesie dezynfekcji ozonem [183]. Należy też zwrócić uwagę na fakt, że ozonowanie zwiększa potencjał ponownego wzrostu drobnoustrojów poprzez wytwarzanie biodegradowalnej materii organicznej (BOM). Ponieważ zmiany w BOM i zbiorowisku drobnoustrojów zachodzące

podczas procesu oczyszczania są skomplikowane, dostępnych jest niewiele informacji na temat tego, jak kształtuje się potencjał ponownego wzrostu drobnoustrojów w wodzie [459,312,460,269]. W literaturze można odnaleźć liczne badania dotyczące stabilności mikrobiologicznej wody. Brak natomiast badań dotyczących jakości mikrobiologicznej ścieków po procesie dezynfekcji i ich stabilności. Istnieje kilka czynników, które wpływają na ten stan rzeczy. Po pierwsze jest to priorytetyzacja badań: woda pitna to kluczowy zasób, a jej jakość bezpośrednio wpływa na zdrowie ludzi, z tego względu badania nad stabilnością mikrobiologiczną wody są często priorytetem; ścieki natomiast, choć również ważne, mogą być postrzegane jako mniej bezpośrednio związane z ludzkim zdrowiem, co może wpłynąć na mniejszą liczbę badań w tej dziedzinie. Po drugie jest to złożoność ścieków: są bardziej złożone niż woda pitna – zawierają różnorodne zanieczyszczenia, w tym bakterie, wirusy, substancje organiczne i chemiczne; badania nad stabilnością mikrobiologiczną ścieków wymagają uwzględnienia tych różnorodnych czynników, co sprawia, że są bardziej wymagające. Po trzecie są to regulacje i standardy: woda pitna jest ściśle regulowana, a standardy jakości są ściśle określone – badania nad stabilnością mikrobiologiczną wody są często wymagane przez różne instytucje regulacyjne; w przypadku ścieków regulacje mogą być mniej restrykcyjne, co może wpłynąć na mniejszą liczbę badań. Warto jednak zwrócić uwagę na współczesne trendy: obecnie coraz większą uwagę przykładana się do ochrony środowiska i zrównoważonego zarządzania zasobami, co może prowadzić do większego zainteresowania badaniami nad ściekami w przyszłości.

Dezynfekcja oczyszczonych ścieków za pomocą ozonu gazowego wiąże się z trudnością w rozpuszczeniu go w ściekach [458]. Przyczynia się jednak do obniżenia takich parametrów jak pH, ChZT, BZT₅, całkowita zawiesina i fosfor ogólny [256]. Dodatkowo znacząco wpływa na zmianę koloru. Według literatury wyjątkiem jest stężenie azotu ogólnego – w przypadku ozonowania stężenie azotu ogólnego w ściekach po dezynfekcji nieznacznie wzrasta. W przeciwieństwie do chloru ozon rozkłada się szybko i całkowicie. Nie ma również szkodliwych pozostałości. Co więcej wytwarzany jest na miejscu, dzięki czemu pojawia się mniej problemów związanych z bezpieczeństwem związanych z transportem i obsługą. Ponadto ozonowanie ścieków ma zalety takie jak: wzrost zawartości rozpuszczonego tlenu, zmniejszenie zużycia środków chemicznych oraz zmniejszenie zmętnienia. Ozonowanie jest naturalnym, ekologicznym środkiem dezynfekcyjnym, na który żadne mikroorganizmy nie wykazują odporności (ma krótki okres półtrwania i szybko przekształca się w atomy tlenu) [172,461]. Ozon jest w rzeczywistości ponaddwukrotnie skuteczniejszy niż chlor, jeśli chodzi o eliminację mikroorganizmów. Ponadto ma zdolność niszczenia związków potencjalnie

rakotwórczych, takich jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), a także eliminowania przykrych zapachów i elementów refrakcyjnych [102]. W Polsce dezynfekcja ścieków komunalnych ozonem nie jest popularna, gdyż jest zbyt droga. Wraz z postępem technologicznym może się to wkrótce zmienić, a wykorzystanie ozonu może stać się bardziej opłacalne.

4. Podsumowanie, wnioski i kierunki dalszych badań

4.1. Podsumowanie

Deficyt wodny jest jednym z najpoważniejszych problemów współczesności, dotyczącym coraz większej liczby regionów na świecie. Wzrost populacji, zmiany klimatyczne, urbanizacja oraz intensywne rolnictwo przyczyniają się do kurczenia zasobów wodnych, co skutkuje niedoborami wody pitnej i użytkowej. Racjonalne zarządzanie zasobami wodnymi jest kluczowe dla zrównoważonego rozwoju. Obejmuje ono zarówno optymalizację zużycia wody, jak i ochronę jej źródeł. Należy pamiętać, że słodka woda, pochodząca przede wszystkim z wód powierzchniowych, jest intensywnie wykorzystywana głównie do celów rolniczych, a wiele rzek, jezior i zbiorników wodnych na świecie znajduje się w złym stanie ekologicznym. Zanieczyszczenia chemiczne, biologiczne i fizyczne, wynikające z działalności człowieka, znacząco pogarszają jakość wód powierzchniowych, wpływając negatywnie na ekosystemy wodne oraz zdrowie ludzi. Ponadto wody powierzchniowe często są wykorzystywane jako odbiorniki ścieków oczyszczonych. I chociaż procesy oczyszczania ścieków mają na celu usunięcie zanieczyszczeń, nie zawsze udaje się wyeliminować wszystkie substancje szkodliwe. To z kolei wpływa na jakość mikrobiologiczną wód, co okazuje się być szczególnie problematyczne podczas letnich upałów, gdy wzrasta ryzyko rozwoju patogenów. Zły stan mikrobiologiczny wód powoduje coroczne zamykanie kąpielisk, zwłaszcza latem, podczas wysokich temperatur. Jest to problem globalny, wynikający m.in. z niedostatecznego oczyszczania ścieków i ich wpływu na jakość wód powierzchniowych.

Ponowne wykorzystanie wody, zwłaszcza w kontekście recyklingu ścieków, staje się coraz popularniejsze jako strategia zarządzania deficytem wodnym. Recykling ścieków może obejmować ich oczyszczanie i ponowne użycie w rolnictwie, przemyśle, a nawet do celów komunalnych. Badania pokazują, że biopreparaty mają duży potencjał w poprawie jakości mikrobiologicznej wód i ścieków, rekultywacji wód powierzchniowych oraz w procesach oczyszczania ścieków. Natomiast ozonowanie i dezynfekcja promieniowaniem UV są już dziś kluczowymi metodami wykorzystywanymi w procesach oczyszczania ścieków, mającymi na celu poprawę jakości wody oraz ochronę zdrowia publicznego i środowiska. Każda z nich ma specyficzne zastosowania oraz unikalne właściwości, które decydują o ich wyborze w zależności od warunków i potrzeb. Wybór między nimi zależy od kilku kluczowych czynników, takich jak rodzaj zanieczyszczeń, skład ścieków, koszty i infrastruktura, a także lokalne regulacje i wymagania dotyczące jakości wody. W niektórych przypadkach najbardziej efektywnym rozwiązaniem może się okazać zastosowanie metod łączonych, takich jak

kombinacja ozonowania i promieniowania UV w połączeniu z biopreparatami. Obecnie łączenie ozonu z ultrafioletem jest stosowane w oczyszczalniach ścieków m.in. w Mediolanie we Włoszech oraz w Singapurze, gdzie zapewnia wielostopniową ochronę przed patogenami i zanieczyszczeniami, umożliwiając bezpieczne ponowne wykorzystanie wody. Przykładem pomocniczego zastosowania technologii dezynfekcji ścieków może być oczyszczalnia ścieków Czajka w Warszawie. Po awarii, do której doszło w 2022 roku, zastosowano ozonowanie jako szybką i skuteczną metodę poprawy jakości ścieków przed ich zrzutem do Wisły. Wybrano ozonowanie ze względu na jego wysoką skuteczność w eliminacji szerokiego spektrum patogenów i zanieczyszczeń organicznych oraz możliwość szybkiego wdrożenia tego rozwiązania w sytuacji kryzysowej, jaką był zrzut nieoczyszczonych ścieków do Wisły. W przyszłości rozważane jest wdrożenie metod łączonych, aby zapewnić jeszcze wyższy poziom bezpieczeństwa mikrobiologicznego i skuteczności oczyszczania.

Przeprowadzone w ramach niniejszej dysertacji doktorskiej badania pozwoliły na potwierdzenie tezy, że możliwa jest higienizacja ścieków bytowych pochodzących z miejskich, komunalnych oczyszczalni ścieków. Proces higienizacji – rozumiany tutaj jako poprawa jakości mikrobiologicznej ścieków oczyszczonych, czyli redukcja liczebności organizmów wskaźnikowych – jest jednak możliwy tylko przy zachowaniu ściśle określonych warunków.

W pierwszym etapie zrealizowanych badań, mającym na celu określenie możliwości wykorzystania biopreparatów w higienizacji ścieków oczyszczonych stwierdzono, że zastosowane biopreparaty dodane bezpośrednio do ścieków oczyszczonych wykazują właściwości stymulujące rozwój bakterii z grupy *coli*. Dobór odpowiedniego biopreparatu i zastosowanie wystarczająco wysokiej dawki pozwoliły jednak na zahamowanie rozwoju bakterii *E. coli* w próbach. Na uwagę zasługuje również, udowodniony w toku badań, wpływ podłoża, na którym namnażają się mikroorganizmy pochodzące z biopreparatów, na skuteczność w eliminacji bakterii – zastosowanie mikroorganizmów oddzielonych od podłoża wpłynęło na poprawę skuteczności ich działania.

W drugim etapie badań potwierdzono wysoką skuteczność usuwania bakterii *coli* ze ścieków dzięki wykorzystaniu promieniowania UV. Zaobserwowano przy tym brak długotrwale utrzymującej się stabilności mikrobiologicznej i odtwarzanie się mikroflory. Aby zoptymalizować efekt przeprowadzonych dezynfekcji, należało po pierwsze prawidłowo dobrać dawkę dezynfektanta, po drugie zaś inkubować próby w niskiej temperaturze, z ograniczonym udziałem światła. Uzyskane wyniki badań znajdują potwierdzenie w procesach oczyszczania i dezynfekcji ścieków przeprowadzanych w warunkach rzeczywistych. W niższych temperaturach woda ma tendencję do mniejszej aktywności biologicznej –

mikroorganizmy są mniej aktywne i mogą być wrażliwsze na promieniowanie UV, co zwiększa skuteczność dezynfekcji. Ponadto zimą jest mniej naturalnego światła słonecznego, co oznacza, że woda w zbiornikach i ściekach jest mniej podatna na promieniowanie UV. W takich warunkach sztuczne promieniowanie UV stosowane w oczyszczalniach ścieków jest bardziej efektywne, ponieważ nie konkuruje z naturalnym światłem UV, które może obniżyć jego skuteczność przez fotoreaktywację uszkodzonych mikroorganizmów. W toku badań udowodniono także, że poprawa jakości mikrobiologicznej ścieków po dezynfekcji UV jest możliwa. Aplikacja mikroorganizmów wyizolowanych z biopreparatu bogatego w bakterie kwasu mlekowego pozwoliła na utrzymanie efektu dezynfekcji i brak odtworzenia bakterii *coli* nawet do 7 dni trwania eksperymentu (dla niskich temperatur).

W trzecim etapie przeprowadzonych badań potwierdzono wysoką skuteczność ozonowania w dezynfekcji ścieków oczyszczonych. Podobnie jak w przypadku promieniowania ultrafioletowego, stwierdzono niestabilność mikrobiologiczną ścieków. Wpływ na rekonstrukcję mikroorganizmów miała zarówno dawka dezynfektanta, jak i temperatura – w przypadku bakterii z grupy *coli* i *E. coli* temperatura 4°C spowodowała zahamowanie rozwoju bakterii w próbach i utrzymanie tego efektu nawet do 7 dnia trwania eksperymentu. Podczas oceny jakości mikrobiologicznej prób stwierdzono jednak, że dodanie biopreparatu do ozonowanych ścieków miało znikomy wpływ na próby umieszczone w temperaturze 4°C, przyspieszyło natomiast odbudowę mikroorganizmów w wyższych temperaturach. Należy pamiętać, że skuteczność ozonowania również może zmieniać się w zależności od pory roku. Ozon jest bardziej stabilny w niższych temperaturach, co oznacza, że jego rozpad przebiega wolniej. W zimie, gdy temperatura wody i otoczenia jest niższa, ozon pozostaje aktywny przez dłuższy czas, co zwiększa jego efektywność dezynfekcyjną.

Otrzymane wyniki oraz sformułowane wnioski pozwalają również na potwierdzenie tez dodatkowych, w myśl których:

- możliwe jest złagodzenie negatywnego wpływu odprowadzanych ścieków oczyszczonych na jakość wód odbiornika;
- możliwe jest wydłużenie czasu skuteczności działania zastosowanych procesów dezynfekcji/higienizacji poprzez wykorzystanie w tym celu odpowiednio wyselekcjonowanych i przygotowanych biopreparatów;
- możliwy jest wzrost potencjału ponownego wykorzystania ścieków poprzez zastosowanie klasycznych metod dezynfekcji ścieków, takich jak ozonowanie

i promieniowanie ultrafioletowe, metod biologicznych – biopreparatów, oraz metod stanowiących połączenie dwóch powyższych;

- możliwe jest wykorzystanie szybkich metod oznaczania mikroorganizmów (luminometria i cytometria przepływowa) w celu ustalenia dawki stosowanego dezynfektanta, co ma kluczowe znaczenie w szybkim reagowaniu na zmieniające się parametry jakości ścieków oczyszczonych i przekłada się na zwiększenie bezpieczeństwa sanitarnego wód odbiornika.

4.2. Wnioski

Realizacja niniejszej rozprawy doktorskiej pozwoliła na sformułowanie wniosków, które ze względu na charakter i strukturę pracy podzielono na trzy grupy tematyczne:

1. Wnioski dot. wykorzystania biopreparatów w higienizacji ścieków oczyszczonych:

- 1.1. Stwierdzono stymulujące działanie zastosowanych biopreparatów na wzrost liczebności bakterii z grupy *coli* oznaczanych metodami hodowlanymi.
- 1.2. W próbach z zastosowaniem biopreparatu Bio-Trakt Plus zaobserwowano, że dawka 10 cm³/dm³ jest w stanie zahamować rozwój bakterii *E. coli*.
- 1.3. Nie zaobserwowano różnicy w skuteczności działania zastosowanego biopreparatu z dodatkowym natlenianiem i bez.
- 1.4. Nie zaobserwowano wpływu formy biopreparatu na jego skuteczność.
- 1.5. Stwierdzono różnice w skuteczności biopreparatów w zależności od rodzaju podłoża, na którym namnażane są mikroorganizmy w biopreparatach.
- 1.6. Zauważono, że zastosowanie mikroorganizmów oddzielonych od podłoża może wpłynąć na lepsze działanie higienizacyjne.
- 1.7. Biopreparaty EM Probiotyki, EM White Refresh i ACS ODO_1 miały korzystny wpływ na zaprzestanie rozmnażania paciorkowców kałowych.
- 1.8. Analizy PCR potwierdziły obecność bakterii *coli* w składzie czterech z pięciu przebadanych prób (ścieków oczyszczonych z dodatkiem biopreparatów). Biopreparat A6 wpłynął na eliminację bakterii *coli* w analizowanych próbach.
- 1.9. Odnotowano negatywny wpływ biopreparatów na barwę i mętność prób. Biopreparaty nie wpływały jednak na stężenie zawiesiny ani na zmianę odczynu pH.

2. Wnioski dot. wykorzystania promieniowania ultrafioletowego w dezynfekcji ścieków oczyszczonych:

- 2.1. Potwierdzono wysoką skuteczność usuwania bakterii *coli* ze ścieków za pomocą promieniowania UV w zakresie badanych prędkości przepływu.
- 2.2. Ścieki oczyszczone po dezynfekcji promieniowaniem UV charakteryzowały się brakiem stabilności mikrobiologicznej. Rekonstrukcja bakteryjna następowała w czasie od 24 do 48 godzin od momentu dezynfekcji promieniami UV efekt ten w warunkach hodowli stałej utrzymywał się przeważnie do 72 godzin.
- 2.3. Zastosowane w badaniach biopreparaty mają działanie stymulujące rozwój lub odbudowę bakterii *coli* w ściekach oczyszczonych po dezynfekcji promieniami UV. Higienizacyjny wpływ zaobserwowano tylko w przypadku zastosowania biopreparatu z bakteriami kwasu mlekowego. Aby uzyskać efekt higienizacji, należy oddzielić mikroorganizmy od podłoża, na którym następuje ich namnażanie.
- 2.4. Bakterie z biopreparatu Em Bio spowodowały utrzymanie efektu dezynfekcji promieniowania UV. W temperaturze 4°C nie obserwowano odbudowy bakterii *coli* przez okres 7 dni.
- 2.5. Światło powodowało szybszą i intensywniejszą reaktywację komórek bakteryjnych.
- 2.6. Temperatura ma istotny wpływ na szybkość rekonstrukcji bakteryjnej – najmniejszy wzrost bakterii nastąpił w próbkach umieszczonych w lodówce w temperaturze 4°C.
- 2.7. Szybkie techniki mikrobiologiczne (ATP i FCM) umożliwiają uzyskanie informacji o jakości mikrobiologicznej oczyszczonych ścieków. Zastosowanie tej oceny pozwoli na regulację dawki promieniowania w zależności od jakości dezynfekowanych ścieków.

3. Wnioski dot. wykorzystania ozonowania w dezynfekcji ścieków oczyszczonych:

- 3.1. Potwierdzono skuteczność ozonu w procesach dezynfekcji oczyszczonych ścieków. W miarę wydłużania się czasu kontaktu z ozonem stwierdzono mniejszą liczebność bakterii mezofilnych, psychrofilnych oraz bakterii z grupy *coli* i *E. coli*.
- 3.2. Zastosowanie 9-minutowego czasu kontaktu ozonu „z generatorem 7 g/h” nie spowodowało całkowitej eliminacji mikroorganizmów z oczyszczonych ścieków. Optymalny okazał się dopiero czas kontaktu wynoszący 11 minut.
- 3.3. Stwierdzono niestabilność mikrobiologiczną ścieków po procesie biologicznego oczyszczania. Zaobserwowano wpływ temperatury na odbudowę mikroorganizmów.

Wyższe temperatury inkubacji próbek powodowały szybszą rekonstrukcję bakterii. W przypadku bakterii z grupy *coli* i *E. coli* temperatura 4°C spowodowała zahamowanie rozwoju bakterii w próbach i utrzymanie tego efektu nawet do 7 dnia trwania eksperymentu.

- 3.4. Potwierdzono, że szybkie techniki oznaczania mikrobiologicznego (ATP, FCM) umożliwiają regulację dawki ozonu w zależności od jakości dezynfekowanych ścieków.
- 3.5. Zastosowanie biopreparatu w próbach ścieków po ozonowaniu skutkowało wzrostem liczebności bakterii *coli*.
- 3.6. Obserwowano wpływ czasu ozonowania na barwę ścieków. Im dłuższy czas, tym niższa barwa określona w Pt mg/l.

4.3. Kierunki dalszych badań

Realizacja rozprawy doktorskiej oraz osiągnięcie wyznaczonych celów pracy pozwoliły na określenie kierunków dalszych badań naukowych w podjętej tematyce:

1. Długoterminowa ocena wpływu biopreparatów na ekosystemy wodne oraz opracowanie nowych, bardziej zaawansowanych biopreparatów przeznaczonych do higienizacji ścieków czy rekultywacji wód;
2. Badanie możliwości integracji biopreparatów z innymi technologiami oczyszczania i dezynfekowania ścieków w celu stworzenia bardziej kompleksowych i efektywnych systemów zarządzania jakością wód;
3. Optymalizacja technologii procesów trzeciego i czwartego stopnia oczyszczania ścieków wynikających z nowelizacji dyrektywy o oczyszczaniu ścieków komunalnych, m.in. poprzez opracowanie optymalnych warunków pozwalających na wydłużenie czasu stabilności mikrobiologicznej ścieków w celu ich bezpiecznego sanitarnie, ponownego wykorzystania np. do nawadniania;
4. Doskonalenie metod oznaczania bakterii *coli* metodami hodowlanymi, tak aby stężenie laktozy w próbce nie było czynnikiem przeszkadzającym;
5. Opracowanie metodologii oznaczania obecności bakterii *coli* i/lub innych mikroorganizmów z wykorzystaniem cytometrii przepływowej (specyficzne bramkowanie wskazanych populacji bakteryjnych, w celu zastąpienia tradycyjnych metod opartych na czasochłonnych i nieprecyzyjnych technikach hodowlanych);

6. Rozpowszechnianie metodologii wykorzystania szybkich technik takich jak luminometria ATP czy cytometria przepływowa FCM w celu szybkiego określenia optymalnej dawki dezynfektanta niezbędnej dla prawidłowego przebiegu procesów dezynfekcji.

5. Spis wykresów

Wykres 1. Liczba ścieków komunalnych wytwarzanych w wybranych latach pomiędzy 2000–2022 r. wraz z metodami ich oczyszczania.....	33
Wykres 2. Liczebność bakterii <i>coli</i> w zależności od dawki biopreparatu, uśrednione wyniki z badań realizowanych w kolejnych seriach (1–3); załącznik 4.....	96
Wykres 3. Liczebność bakterii <i>E. coli</i> w zależności od dawki biopreparatu, uśrednione wyniki z badań realizowanych w kolejnych seriach (1–3); załącznik 4.....	98
Wykres 4. Zmiany wartości RLU w czasie 7 dni badania wpływu dawki biopreparatu na skuteczność usuwania bakterii z grupy <i>coli</i> ; załącznik 5.....	98
Wykres 5. Zmiany wartości RLU w badaniu wpływu dawki biopreparatu na skuteczność usuwania bakterii z grupy <i>coli</i> po 48h; załącznik 6.....	99
Wykres 6. Analiza FCM dla prób z zastosowaniem biopreparatu Bio-Trakt Plus w dawkach 1, 5 i 10 cm ³ oraz w próbie kontrolnej; załącznik 7.....	99
Wykres 7. Liczba bakterii <i>coli</i> w próbie kontrolnej i w próbach z biopreparatami; załącznik 8.....	100
Wykres 8. Liczba bakterii <i>E.coli</i> w próbach kontrolnej i w próbach z biopreparatami w kolejnych godzinach doświadczenia; załącznik 8.....	101
Wykres 9. Zmiany wartości RLU w badaniu wpływu czasu na skuteczność usuwania bakterii z grupy <i>coli</i> ze ścieków oczyszczonych; załącznik 9.....	101
Wykres 10. Zmiany wartości RLU w próbach z zastosowaniem biopreparatów: ACS ODO_1, ACS ODO_1 z dodatkowym natlenianiem oraz w próbie kontrolnej; załącznik 11.....	103
Wykres 11 a-b. Analiza FCM. Wpływ tlenu na skuteczność usuwania bakterii z grupy <i>coli</i> ze ścieków oczyszczonych; załącznik 12.....	103
Wykres 12 a-b. Zmiany wartości RLU w badaniu wpływu formy aplikacji biopreparatu na skuteczność usuwania bakterii z grupy <i>coli</i> ze ścieków oczyszczonych; załącznik 14.....	105
Wykres 13. Analiza FCM. Wpływ formy aplikacji biopreparatu na skuteczność usuwania bakterii z grupy <i>coli</i> ze ścieków oczyszczonych; załącznik 15.....	105
Wykres 14 a-b. Liczebność bakterii <i>coli</i> i <i>E. coli</i> w próbach po 24h, po rozróżnieniu na podłożu biopreparatu; serie 1–3; załącznik 16.....	107
Wykres 15. Zmiany wartości RLU w badaniu wpływu podłoża zastosowanego biopreparatu ma wpływ na skuteczność usuwania bakterii z grupy <i>coli</i> ze ścieków oczyszczonych; załącznik 17.....	107
Wykres 16 a-f. Analiza FCM. Wpływ podłoża zastosowanego biopreparatu na skuteczność usuwania bakterii z grupy <i>coli</i> ze ścieków oczyszczonych; załącznik 18.....	109
Wykres 17 a-b. Liczebność bakterii <i>coli</i> i <i>E. coli</i> w ściekach oczyszczonych, wzbogaconych biopreparatem A7 z podłożem oraz z wyizolowanym podłożem, w zależności od temp. 4, 15 i 28°C; załącznik 19.....	110

Wykres 18 a-c. Zmiany wartości RLU w badaniu wpływu podłoża, na którym namnażają się mikroorganizmy z biopreparatu A7, ma wpływ na skuteczność usuwania bakterii z grupy <i>coli</i> ze ścieków oczyszczonych dla temp. 4,15 i 28°C; załącznik 20.....	111
Wykres 19 a-b. Analiza FCM. Wpływ podłoża, na którym namnażają się mikroorganizmy, na skuteczność usuwania bakterii z grupy <i>coli</i> ze ścieków oczyszczonych; inkubacja prób w temp. 4 °C; załącznik 21.....	112
Wykres 20 a-b. Analiza FCM. Wpływ podłoża, na którym namnażają się mikroorganizmy od biopreparatu, ma wpływ na skuteczność usuwania bakterii z grupy <i>coli</i> ze ścieków oczyszczonych dla temp. 15°C; załącznik 21.....	113
Wykres 21 a-b. Wpływ podłoża, na którym namnażają się mikroorganizmy od biopreparatu A7, ma wpływ na skuteczność usuwania bakterii z grupy <i>coli</i> ze ścieków oczyszczonych dla temp. 28°C; załącznik 21.....	114
Wykres 22. Liczba paciorkowców kałowych w próbach z: EM Probiotyk, EM White Refresh i ACS ODO_1 oraz w próbie kontrolnej; załącznik 22.....	115
Wykres 23. Liczba paciorkowców kałowych w próbach z zastosowaniem biopreparatu Bio-Trakt Plus oraz w próbie kontrolnej; załącznik 23	116
Wykres 24. Wpływ biopreparatów na pH próby; załącznik 25.....	117
Wykres 25. Wpływ biopreparatów na barwę próby; załącznik 25.....	117
Wykres 26. Wpływ biopreparatów na mętność próby; załącznik 25	118
Wykres 27. Zmiany wartości RLU (ATP ogólnego) dla poszczególnych szybkości dezynfekcji UV w kolejnych seriach badań; załącznik 27	126
Wykres 28. Zależność pomiędzy całkowitym ATP i zewnątrzkomórkowym ATP dla poszczególnych szybkości dezynfekcji UV; załącznik 27.....	127
Wykres 29. Analiza FCM. Wpływ promieniowania UV na liczbę komórek martwych [LNA] reg.1 i uszkodzonych (reg.2) oraz komórek żywych [HNA] reg.3; załącznik 28	127
Wykres 30. Całkowita liczba bakterii w próbie kontrolnej w kolejnych godzinach doświadczenia; załącznik 29.....	129
Wykres 31. Liczebność bakterii w próbce UV40 w kolejnych godzinach doświadczenia; załącznik 29	129
Wykres 32. Całkowita liczba bakterii w próbce UV100 w kolejnych godzinach doświadczenia; załącznik 29.....	129
Wykres 33 a-b. Wpływ biopreparatów na liczebność bakterii <i>coli</i> w ściekach oczyszczonych i po dezynfekcji promieniami UV po 24h; załącznik 30.....	132
Wykres 34 a-b. Zmiany wartości RLU po 24h w ściekach po dezynfekcji UV i z dodatkiem biopreparatów – inkubowane w temp. 4 i 20°C; załącznik 31	133
Wykres 35. Analiza FCM po 24h w ściekach po dezynfekcji UV i z dodatkiem biopreparatów – inkubowane w temp. 4°C; załącznik 32	134

Wykres 36. Analiza FCM po 24h w ściekach po dezynfekcji UV i z dodatkiem biopreparatów – inkubowane w temp. 20°C z dodatkowym naświetlaniem; załącznik 32.....	135
Wykres 37. Analiza FCM po 24h w ściekach po dezynfekcji UV i z dodatkiem biopreparatów – inkubowane w temp. 20°C z ograniczonym dostępem światła; załącznik 32	135
Wykres 38. Liczebność bakterii <i>coli</i> w próbach ścieków oczyszczonych – K, po dezynfekcji (UV) oraz z dodatkiem mikroorganizmów z biopreparatu EM Bio; załącznik 30	136
Wykres 39. Zmiany wartości RLU dla różnych czasów dezynfekcji ozonem w serii 1; załącznik 35	142
Wykres 40. Zmiany wartości RLU dla różnych czasów dezynfekcji ozonem w serii 2; załącznik 36	143
Wykres 41. Analiza FCM. Wpływ na liczbę komórek martwych [LNA] i komórek żywych [HNA] podczas dezynfekcji ozonem; załącznik 37.....	143
Wykres 42. Analiza FCM. Wpływ czasu ozonowania na liczbę komórek martwych [LNA] i komórek żywych [HNA]; załącznik 38	144
Wykres 43. Analiza FCM. Wpływ czasu ozonowania na liczbę komórek martwych [LNA] i komórek żywych [HNA]; załącznik 37	144
Wykres 44. Analiza FCM. Wpływ czasu ozonowania na liczbę komórek żywych [HNA] i komórek martwych [LNA] – zależność w procentach; załącznik 38	144
Wykres 45 a-e. Zmiany liczebności bakterii psychrofilnych, mezofilnych, bakterii z grupy <i>coli</i> i <i>E. coli</i> oraz form przetrwalnikowych podczas badania stabilności dla 9 minut ozonowania; załącznik 39...	148
Wykres 46 a-d. Zmiany liczebności bakterii <i>coli</i> , <i>E. coli</i> , mezofilnych i psychrofilnych podczas badania stabilności 11min; załącznik 40.....	150
Wykres 47. Zmiany wartości RLU ścieków po ozonowaniu; wariant 1; badanie w temperaturach 4, 15 i 28°C; załącznik 41	152
Wykres 48. Zmiany wartości RLU ścieków po ozonowaniu; wariant 2; badanie w temperaturach 4, 15 i 28°C; załącznik 42.....	152
Wykres 49 a-b. Analiza FCM w stabilności mikrobiologicznej ścieków dezynfekowanych ozonem; załącznik 43.....	153
Wykres 50 a-b. Liczba bakterii <i>coli</i> w próbie kontrolnej (ściekach oczyszczonych) i po ozonowaniu oraz z dodatkiem biopreparatu w skali logarytmicznej; załącznik 44.....	156
Wykres 51 a-c. Zmiany wartości RLU. ATP ogólne, seria1, temp 4,15 i 28°C; załącznik 45.....	157
Wykres 52 a-c. Zmiany wartości RLU. ATP ogólne i zewnątrzkomórkowe, seria2, temp 4,15 i 28°C; załącznik 45	159
Wykres 53. Analiza FCM. Próby po ozonowaniu i z dodatkiem biopreparatu inkubowane w temperaturze 4 °C; załącznik 46.....	160
Wykres 54 a-b. Analiza FCM. Próby po ozonowaniu i z dodatkiem biopreparatu inkubowane w temperaturze 15°C; załącznik 46.....	162
Wykres 55 a-b. Analiza FCM w [%]. Próby po ozonowaniu i z dodatkiem biopreparatu inkubowane w temperaturze 28°C; załącznik 46.....	163

Wykres 56. Wpływ długości/dawek ozonowania na barwę ścieków; załącznik 47	164
---	-----

6. Spis rysunków

Rysunek 1. Zasoby wodne w Europie (stan na 2021r.) przypadające na jednego mieszkańca	10
Rysunek 2. Gminy, w których wystąpiła susza rolnicza w latach 2007–2018,	11
Rysunek 3. Schemat działania preparatu enzymatyczno-bakteryjnego.....	51
Rysunek 4. Usytuowanie Miejskiej Oczyszczalni Ścieków w Tarnobrzegu.....	77
Rysunek 5. Lokalizacja oczyszczalni w Tarnobrzegu ul. Podwałe 4	77
Rysunek 6. Odbiornik ścieków oczyszczonych – rzeka Wisła	78
Rysunek 7. Widok na oczyszczalnię ścieków w Rzeszowie	80
Rysunek 8 a-c. Analiza FCM ścieków oczyszczonych	102
Rysunek 9 a-b. Analiza FCM. Wpływ promieniowania UV na liczbę żywych komórek.....	128
Rysunek 10 a-f. Analiza FCM ścieków oczyszczonych i w poszczególnych minutach ozonowania; seria 1	145
Rysunek 11 a-i. Analiza FCM ścieków oczyszczonych i w kolejnych minutach ozonowania; seria 2	146
Rysunek 12. Zmiana populacji bakteryjnej w zależności od czasu i temperatury	154
Rysunek 13. Analiza FCM. Wpływ biopreparatu na rozwój mikroorganizmów w temp. 4°C po upływie 24h.....	160
Rysunek 14. Analiza FCM. Wpływ czasu na rozwój mikroorganizmów z biopreparatu w próbie po ozonowaniu, na przykładzie próby z biopreparatem umieszczonej w cieplarni w temp. 15°C	161
Rysunek 15. Analiza FCM. Wpływ temperatury na rozwój biopreparatów w próbach, przykład po upływie 48h.....	164

7. Spis tabel

Tabela 1. Ponowne wykorzystanie ścieków i cele na przyszłość. Przykłady z kraju i ze świata [opracowanie własne na podstawie danych literaturowych]	26
Tabela 2. Wielkość ładunku zanieczyszczeń/Odływ substancji organicznych i biogennych rzekami wprowadzany do wód Morza Bałtyckiego za pośrednictwem rzek w tysiącach ton na rok;	30
Tabela 3. Usuwanie lub unieszkodliwianie mikroorganizmów w procesach oczyszczania ścieków....	34
Tabela 4. Przeżywalność organizmów chorobotwórczych w ściekach miejskich	42

Tabela 5. Charakterystyka najważniejszych bakterii chorobotwórczych.....	42
Tabela 6. Rodzaje bakterii zdolnych do produkcji bakteriocyn	53
Tabela 7. Charakterystyka biopreparatów wykorzystanych w pracy	82
Tabela 8. Konfiguracje w jakich przeprowadzono poszczególne serie badawcze, w zależności od czynnika determinującego	83
Tabela 9. Dawka ozonu w zależności od czasu ozonowania	88
Tabela 10. Metody badawcze wykorzystywane do analiz ścieków oczyszczonych wykonywane przez akredytowane laboratorium w Tarnobrzegu.....	91
Tabela 11. Metody badawcze wykorzystywane do analiz	91
Tabela 12. Wskaźniki jakości mikrobiologicznej badanych ścieków i biopreparatów	92
Tabela 13. Parametry ścieków oczyszczonych; załącznik 2 i 3	96
Tabela 14. Wyniki badań metodą PCR na obecność bakterii z grupy <i>coli</i> w ściekach oczyszczonych z dodatkiem biopreparatów; załącznik 24a-c	116
Tabela 15. Wartości parametrów S dla UV40 dla poszczególnych rodzajów drobnoustrojów i wariantów inkubacji	130
Tabela 16. Wartości parametrów S dla UV100 dla poszczególnych rodzajów drobnoustrojów i wariantów inkubacji	130
Tabela 17. Wpływ czasu ozonowania na efekt dezynfekcji; załącznik 33	141
Tabela 18. Skuteczność działania ozonu w eliminacji bakterii; załącznik 34	142
Tabela 19. Wartości parametrów S dla czasu ozonowania 9 minut, dla poszczególnych rodzajów drobnoustrojów i wariantów inkubacji	150
Tabela 20. Wartości parametrów S dla czasu ozonowania 11 minut dla poszczególnych rodzajów drobnoustrojów i wariantów inkubacji	151

8. Załączniki

Załącznik 1. Liczba ścieków komunalnych wytwarzanych w wybranych latach pomiędzy 2000–2022 r. wraz z metodami ich oczyszczania. [źródło: opracowanie własne na podstawie].

Ścieki komunalne odprowadzane siecią kanalizacyjną	2000	2005	2010	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
	[hm ³]										
Ścieki komunalne wymagające oczyszczania	1494	1274	1 298	1 258	1 290	1 317	1 330	1343	1344	1367	1364,2
Ścieki oczyszczane, w tym:	1243	1140	1 242	1 254	1 289	1 316	1 329	1337	1334	1356	1360,4
– mechanicznie	84,8	49,9	1,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,3
– biologicznie	705,8	367,2	228,2	189,9	197,2	207,6	200,5	202,0	210,3	219,8	209,1
– z podwyższonym usuwaniem biogenów	451	723	1 013	1 064	1 091	1 108	1 128	1134	1123	1136	1150,9
Ścieki nieoczyszczone	250,5	133,6	55,4	4,1	1,2	1	1,6	6,7	10,4	11,2	3,9

Załącznik 2. Parametry ścieków oczyszczonych w Tarnobrzegu

oznaczenie [mg/l]	miesiące											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Azot Kjeldahla	4,66±0,75	2,52±0,40	1,49±0,5	1,29±0,20	3,63±0,58	2,85±0,6	3,21±0,51	2,47±0,36	2,92±0,47	3,25±0,52	3,88±0,62	4,27±0,68
Azot azotanowy	6,83±0,03	12,2±1,83	10,8 ± 1,6	12,3 ± 1,8	9,45 ± 1,41	10,4 ± 1,6	11,5 ± 1,7	6,77 ± 1,01	10,8±1,62	11,0±1,65	8,78±1,32	10,6±1,59
azot azotynowy	0,01±0,01	< 0,01	0,04 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,15 ± 0,03	0,01±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01
azot ogólny	11,5±0,75	14,7 ± 1,83	12,3 ± 2,4	13,6 ± 1,8	13,1 ± 1,5	13,3 ± 1,7	14,8 ± 1,8	9,39 ± 1,09	13,7 ± 1,69	14,3±1,73	12,7±1,46	14,9±1,73
azot amonowy	0,1±0,01	< 0,1	<0,1	< 0,1	<0,1	0,38 ± 0,06	0,12 ± 0,02	<0,1	0,1±0,01	0,10±0,01	0,1±0,01	0,1±0,01
fosfor ogólny	0,64±0,10	1,83 ± 0,31	0,13 ± 0,1	0,75 ± 1,10	1,59 ± 0,30	1,04 ± 0,2	0,42 ± 0,07	0,76 ± 0,03	1,15±0,19	0,26±0,04	1,97±0,33	1,95±0,33

ChZT	36,0±6,12	37,4 ± 6,36	39,5 ± 8,3	25,4 ± 4,3	33,7 ± 5,8	47,710	84,1 ± 14,3	43,1 ± 7,3	31,0±5,27	30,5±5,19	28,0±4,76	39,5±6,71
BZT5	3,3±0,5	4,29±0,64	3,9 ± 0,6	4,8 ± 0,9	5,6 ± 1,0	3,9 ± 0,6	5,6 ± 0,8	2,7 ± 0,4	2,1±0,3	3,2±0,5	2,2±0,3	3,6±0,5
zawiesiny ogólne	4,5±0,8	5,8±1,0	3,8 ± 0,7	8,8 ± 1,5	2,5 ± 2,1	5,1 ± 0,9	3,4 ± 0,6	3,7 ± 0,8	2,1±0,4	2,0±0,3	2,9±0,5	4,6±0,8

Załącznik 3. Parametry ścieków oczyszczonych w Rzeszowie

oznaczenie [mg/l]	miesiące											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
azot azotynowy	0,050		0,020		0,014		0,013		0,014		0,026	
azot ogólny	8,2	7,8	7,2	9,4	6,8	6,1	6,5	8,1	7,0	6,5	6,3	7,3
azot amonowy	0,29	0,35	0,26	0,32	0,10	0,28	0,00	3,61	0,00	0,00	0,19	0,09
fosfor ogólny	0,71	0,66	0,71	0,85	0,46	0,49	0,50	1,28	0,40	0,36	0,49	0,54
ChZT	44,0	43,1	44,7	46,9	37,9	41,0	39,7	47,6	40,0	41,1	45,6	43,9
BZT5	6,4	7,6	7,8	10,1	4,4	5,6	4,8	4,7	3,3	3,6	4,0	4,9
zawiesiny ogólne	13,7	17,1	18,1	17,17	8,8	8,3	8,2	8,6	7,0	5,8	11,1	13,1

Załącznik 4. Liczebność bakterii *coli* w zależności od dawki biopreparatu, uśrednione wyniki z badań realizowanych w kolejnych seriach (1–3)

Zastosowana metoda oznaczania	próba	<i>Coli</i>	<i>E.coli</i>
		[jtk/100cm ³]	
Seria 1			
metoda filtracji membranowej	Ścieki oczyszczone	4,5x10 ²	1,3 x10 ¹
	Dawka 1cm ³ Biopreparatu Bio-Trakt Plus	2 x10 ⁴	6
	Dawka 5cm ³ Biopreparatu Bio-Trakt Plus	2,9 x10 ³	5
	Dawka 10cm ³ Biopreparatu Bio-Trakt Plus	1 x10 ³	2
	Dawka 1cm ³ Biopreparatu ACS ODO_1	1,98x10 ⁴	1,3 x10 ¹
	Dawka 5cm ³ Biopreparatu ACS ODO_1	2,71 x10 ³	5
	Dawka 10cm ³ Biopreparatu ACS ODO_1	9,5 x10 ²	0
Seria 2			

metoda filtracji membranowej	Ścieki oczyszczone	2,1 x10 ³	2,5 x10 ¹
	Ścieki oczyszczone	3 x10 ³	0
	Dawka 1cm ³ Biopreparatu Bio-Trakt Plus	3,6 x10 ⁴	1,6 x10 ¹
	Dawka 1cm ³ Biopreparatu Bio-Trakt Plus	1,9 x10 ⁴	2
	Dawka 5 cm ³ Biopreparatu Bio-Trakt Plus	1 x10 ³	2 x10 ¹
	Dawka 5 cm ³ Biopreparatu Bio-Trakt Plus	2,3 x10 ³	2
	Dawka 10 cm ³ Biopreparatu Bio-Trakt Plus	1,75 x10 ³	0
	Dawka 10 cm ³ Biopreparatu Bio-Trakt Plus	1,55 x10 ³	0
	Dawka 1 cm ³ Biopreparatu ACS ODO_1	2,9 x10 ⁴	1,8 x10 ¹
	Dawka 1 cm ³ Biopreparatu ACS ODO_1	1,75 x10 ⁴	9
	Dawka 5 cm ³ Biopreparatu ACS ODO_1	1 x10 ³	1,5 x10 ¹
	Dawka 5 cm ³ Biopreparatu ACS ODO_1	1,9 x10 ³	5
	Dawka 10 cm ³ Biopreparatu ACS ODO_1	2,25 x10 ³	0
	Dawka 10 cm ³ Biopreparatu ACS ODO_1	1,72 x10 ³	1
Seria 3			
metoda posiewu głębinowego	Ścieki oczyszczone	1 x10 ³	5
	Ścieki oczyszczone	2 x10 ²	2
	Dawka 1 cm ³ Biopreparatu Bio-Trakt Plus	1,6 x10 ⁴	3
	Dawka 1 cm ³ Biopreparatu Bio-Trakt Plus	1 x10 ⁴	0
	Dawka 5 cm ³ Biopreparatu Bio-Trakt Plus	5 x10 ³	0
	Dawka 5 cm ³ Biopreparatu Bio-Trakt Plus	2,1 x10 ²	0
	Dawka 10 cm ³ Biopreparatu Bio-Trakt Plus	3,1 x10 ²	0
	Dawka 10 cm ³ Biopreparatu Bio-Trakt Plus	1 x10 ²	0
	Dawka 1 cm ³ Biopreparatu ACS ODO_1	1,55 x10 ⁴	5
	Dawka 1 cm ³ Biopreparatu ACS ODO_1	1,2 x10 ⁴	3
	Dawka 5 cm ³ Biopreparatu ACS ODO_1	2,5 x10 ³	2
	Dawka 5 cm ³ Biopreparatu ACS ODO_1	1,9 x10 ²	1
	Dawka 10 cm ³ Biopreparatu ACS ODO_1	1,4 x10 ³	0
	Dawka 10 cm ³ Biopreparatu ACS ODO_1	1,4 x10 ²	0

Załącznik 5. Zmiany wartości RLU w czasie 7 dni badania wpływu dawki biopreparatu na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli*

	0h	24h	48h	72h	7dni
Ścieki oczyszczone	2 312 020	3 380 456	4 322 562	8 902 533	13 053 024
1cm ³	13 087 020	51 786 380	45 555 148	53 581 740	41 791 332
5cm ³	15 033 288	37 668 544	53 346 124	57 987 684	145 714 720
10cm ³	14 575 543	44 085 720	38 391 764	45 178 800	120 374 411

Załącznik 6. Zmiany wartości RLU w badaniu wpływu dawki biopreparatu na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* po 48h

	seria 1		seria 2		seria 3	
	0h	48h	0h	48h	0h	48h
Ścieki oczyszczone	498 400	30 063 064	7 575 256	4 294 723	2 312 020	4 322 562
1 cm ³	1 135 325	49 738 352	1 960 276	9 226 948	13 087 020	45 555 148
5 cm ³	2 124 583	42 134 018	3 677 444	11 270 160	15 033 288	53 346 124
10 cm ³	7 659 674	44 737 692	8 034 515	13 166 415	14 575 543	38 391 764

Załącznik 7. Analiza FCM dla prób z zastosowaniem biopreparatu Bio-Trakt Plus w dawkach 1, 5 i 10 cm³ oraz w próbie kontrolnej

		FCM	
		Reg.1 [HNA]	Reg.2 [LNA]
1 seria	Ścieki oczyszczone	9 413	41 936
	1cm ³	434 064	133 582
	5 cm ³	267 361	93 614
	10 cm ³	509 183	79 390
2 seria	Ścieki oczyszczone	60 857	25 012
	1 cm ³	978 428	258 426
	5 cm ³	902 969	325 022
	10 cm ³	993 063	335 187
3 seria	Ścieki oczyszczone	14 580	35 990
	1 cm ³	340 987	41 334
	5 cm ³	515 664	95 555
	10 cm ³	809 127	113 991

Załącznik 8. Liczba bakterii coli w próbie kontrolnej i w próbach z biopreparatami

	Próba kontrola		Biopreparat SCD2		Biopreparat ACS AQUA		Biopreparat Em FARMA		Biopreparat QUANTUM	
	<i>coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>coli</i>	<i>E.coli</i>
	[jtk/100cm ³]									
0h	6,6x10 ²	1x10 ²	6,6x10 ²	1x10 ²	6,6x10 ²	1x10 ²	6,6x10 ²	1x10 ²	6,6x10 ²	1x10 ²
24h	5,8x10 ²	7,6x10 ¹	8,1x10 ⁴	1,6x10 ³	3,3x10 ⁴	6x10 ²	7,9x10 ⁴	1x10 ¹	1,8x10 ³	8x10 ¹
48h	2,6x10 ²	3,1x10 ¹	9,6x10 ⁴	8x10 ²	2,5x10 ⁴	3,3x10 ¹	6,2x10 ⁴	8	2,4 x 10 ²	0
78h	3x10 ¹	3	2x10 ⁴	1x10 ¹	3,7x10 ³	5	1,4x10 ³	1	0	0
7dni	5x10 ¹	0	1x10 ³	0	1,1x10 ³	0	4,0x10 ³	0	2,5x10 ¹	0

Załącznik 9. Zmiany wartości RLU w badaniu wpływu czasu na skuteczność usuwania bakterii z grupy coli ze ścieków oczyszczonych

	Ścieki oczyszczone	Biopreparat SCD2	Biopreparat ACS AQUA	Biopreparat Em FARMA	Biopreparat QUANTUM
0h	1 496 984	1 758 397	1 752 923	1 760 653	1 678 010
24h	1 763 611	17 810 700	6 479 922	7 630 367	7 877 504
48h	3 172 705	27 529 632	27 295 522	17 663 196	6 417 388
72h	2 156 962	78 242 600	46 457 424	31 304 386	6 866 907
7dni	7 466 772	64 897 560	44 593 968	143 525 840	4 951 199

Załącznik 10. Wpływ dodatkowego natleniania na skuteczność usuwania bakterii z grupy coli ze ścieków oczyszczonych

	Ścieki oczyszczone	Biopreparat ACS_ODO1 z dodatkowym natlenianiem	Biopreparat ACS_ODO1 z ograniczonym dostępem tlenu
	[jtk/100cm ³]		
Seria 1	1,1 x 10 ⁴	1,4 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁶
Seria 2	3,0 x 10 ¹	3,0 x 10 ³	9,2 x 10 ²
Seria 3	1,3 x 10 ³	2,4 x 10 ⁴	1,1 x 10 ³
Seria 4	3,5 x 10 ¹	1,3 x 10 ⁴	1,4 x 10 ⁴

Załącznik 11. Zmiany wartości RLU w próbach z zastosowaniem biopreparatów: ACS ODO_1, ACS ODO_1 z dodatkowym natlenianiem oraz w próbie kontrolnej

	Próba kontrolna	ACS ODO_1	ACS ODO_1 z dodatkowym natlenianiem
0h	5 098 667	5 098 667	5 098 667
24h	1 862 252	88 160 586	48 149 692
48h	3 258 720	77 705 944	35 569 852
72h	3 125 896	65 236 522	16 754 173
7dni	3 985 258	60 458 221	18 120 125

Załącznik 12. Analiza FCM. Wpływ tlenu na skuteczność usuwania bakterii z grupy coli ze ścieków oczyszczonych

	ODO_1 z ograniczonym dostępem tlenu		ODO_1 z dodatkowym natlenianiem	
	Reg. 1	Reg.2	Reg. 1	Reg.2
0h	48 934	48 647	23 521	20 003
24h	31 566	23 903	18 235	17 012
48h	9 817	7 472	8 982	9 102
72h	11 525	18 584	10 784	11 014
7dni	11 971	12 857	9 987	8 021

Załącznik 13. Liczebność bakterii *coli* z próbach z biopreparatem aplikowanym w formie zliofilizowanej i płynnej

	Rodzaj próby	Liczba bakterii <i>coli</i> jtk/100cm ³
0h	Ścieki oczyszczone	8,6 x 10 ²
24h	Ścieki oczyszczone	1,8 x 10 ²
	Biopreparat FreeFlow w formie zliofilizowanej	3,1 x 10 ²
	Biopreparat FreeFlow w formie płynnej	3,3 x 10 ²

Załącznik 14. Zmiany wartości RLU w badaniu wpływu formy aplikacji biopreparatu na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* ze ścieków oczyszczonych

	Seria 1		Seria 2	
	ATP ogólne	ATP zewnątrzkomórkowe	ATP ogólne	ATP zewnątrzkomórkowe
Ścieki oczyszczone	1 520 464	40 154	2 740 996	84 457
Ścieki oczyszczone z Biopreparatem w formie płynnej	18 203 998	91 258	39 166 720	107 111
Ścieki oczyszczone z Biopreparatem w formie zliofilizowanej	48 025 326	101 004	86 099 648	119 173

Załącznik 15. Analiza FCM. Wpływ formy aplikacji biopreparatu na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* ze ścieków oczyszczonych

próba	seria	Reg.1	Reg.1 [%]	Reg.2.	Reg.2. [%]	Reg.3.	Reg.3. [%]
Ścieki oczyszczone	seria 1	11 768	5	55 565	27	122 102	60
	seria 2	11 755	5	76 161	37	75 183	37
Ścieki oczyszczone z Biopreparatem FreeFlow (w formie zliofilizowanej)	seria 1	75 714	12	151 335	24	369 353	58
	seria 2	66 861	10	129 154	19	407 971	62
Ścieki oczyszczone z Biopreparatem FreeFlow (w formie płynnej)	seria 1	17 466	5	207 285	62	97 270	29
	seria 2	23 435	7	229 007	68	46 696	13

Załącznik 16. Liczebność bakterii *coli* i *E. coli* w próbach po 24h, po rozróżnieniu na podłożu biopreparatu; serie 1–3

Próba	Ścieki oczyszczone		Biopreparat EM Probiotyk		Biopreparat EM White Refresh		Biopreparat A6		Biopreparat Bio-Trakt Plus		Biopreparat QUANTUM	
	<i>coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>coli</i>	<i>E.coli</i>
podłoże	-		Melasa z trzciny cukrowej		Koncentrat owocowy i ekstrakt z otrąb ryżowych		Melasa z trzciny cukrowej (II)		Wyciągi ziołowe		Kwas humusowy/ humus torfowy	
Seria	<i>coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>coli</i>	<i>E.coli</i>
	[jtk/100cm ³]											
Seria 1	5x10 ¹	6	5,6 x 10 ²	7x10 ¹	5x 10 ²	3 x 10 ¹	1,1 x 10 ³	4 x 10 ¹	1,6 x 10 ⁴	2,6 x 10 ²	1 x 10 ²	8
Seria 2	3x10 ¹	2	2,5 x 10 ²	4x10 ¹	2,8x10 ²	1 x 10 ¹	3 x 10 ³	8	1 x 10 ⁴	1,1 x 10 ¹	1,6 x 10 ²	2 x 10 ¹
Seria 3	1,1x10 ¹	0	1,9 x 10 ²	2 x 10 ¹	1,2x10 ²	0	9,3 x 10 ³	1,3 x10 ¹	1 x 10 ⁴	9	2,1 x 10 ¹	3

Załącznik 17. Zmiany wartości RLU w badaniu wpływu podłoża zastosowanego biopreparatu ma wpływ na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* ze ścieków oczyszczonych

	Ścieki oczyszczone	Biopreparat EM Probiotyk	Biopreparat EM White Refresh	Biopreparat A6	Biopreparat Bio-Trakt Plus	Biopreparat QUANTUM vsc
podłoże	-	Melasa z trzciny cukrowej	Koncentrat owocowy i ekstrakt z otrąb ryżowych	Melasa z trzciny cukrowej (II)	Wyciągi ziołowe	Kwas humusowy/humus torfowy
0h	1 496 984	3 281 585	3 582 031	73 307 544	15 033 288	1 678 010
24h	1 763 611	17 565 192	16 818 668	67 671 808	37 668 544	7 877 504
48h	3 172 705	35 330 300	35 070 228	59 125 114	53 346 124	6 817 388
72h	2 156 962	43 940 852	32 586 992	55 212 203	57 987 684	6 466 907
7dni	7 466 772	18 077 076	13 204 320	50 125 987	227 844 448	4 951 199

Załącznik 18. Analiza FCM. Wpływ podłoża zastosowanego biopreparatu na skuteczność usuwania bakterii z grupy *coli* ze ścieków oczyszczonych

	Ścieki oczyszczone		Biopreparat EM Probiotyk		Biopreparat EM White Refresh		Biopreparat A6		Biopreparat Bio-Trakt Plus		Biopreparat QUANTUM vsc	
	-		Melasa z trzciny cukrowej		Koncentrat owocowy i ekstrakt z otrąb ryżowych		Melasa z trzciny cukrowej (II)		Wyciągi ziołowe		Kwas humusowy/humus torfowy	
	HNA	LNA	HNA	LNA	HNA	LNA	HNA	LNA	HNA	LNA	HNA	LNA
0h	17 738	-	39 383	51 276	28 467	-	68 523	32 125	9 413	41 936	21 036	-
24h	18 386	-	35 285	45 568	29 752	28 409	78 998	35 120	267 361	93 614	22 001	-
48h	18 652	-	7 241	6 107	8 466	-	75 962	21 010	902 969	-	21 850	9 702
72h	10 660	10 739	9 016	14 773	14 835	11 407	42 012	18 555	515 664	95 555	17 223	3 200
7dni	6 055	13 477	7 263	12 328	12 053	16 569	21 547	9 247	73 211	11 325	9 183	1 204

Załącznik 19. Liczebność bakterii *coli* i *E. coli* w ściekach oczyszczonych, wzbogaconych biopreparatem A7 z podłożem oraz z wyizolowanym podłożem, w zależności od temp. 4, 15 i 28°C;

	próba	4°C		15°C		28°C	
		<i>Coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>Coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>Coli</i>	<i>E.coli</i>
		[jtk/100cm ³]					
0h	Ścieki oczyszczone	1,4 x 10 ³	1,5 x 10 ¹	1,4 x 10 ³	1,5 x 10 ¹	1,4 x 10 ³	1,5 x 10 ¹
24h	Ścieki oczyszczone	4 x 10 ¹	0	6 x 10 ¹	0	1 x 10 ²	6 x 10 ¹
	Ścieki Oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	4 x 10 ²	5	3,4 x 10 ³	1,1 x 10 ¹	6 x 10 ⁴	1,6 x 10 ¹
	Ścieki Oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	0	0	2 x 10 ²	0	3,6 x 10 ³	0
48h	Ścieki oczyszczone	5,5 x 10 ¹	2 x 10 ¹	7,6 x 10 ¹	0	8,2 x 10 ¹	2 x 10 ¹
	Ścieki Oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	4,5 x 10 ¹	5	6 x 10 ⁴	4 x 10 ²	4,8 x 10 ⁴	2 x 10 ²
	Ścieki Oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	1 x 10 ²	1 x 10 ¹	1 x 10 ³	1,5 x 10 ¹	0	2,8 x 10 ¹
72h	Ścieki oczyszczone	4,5 x 10 ¹	0	3,4 x 10 ¹	5	5,7 x 10 ¹	0 jtk/cm ³
	Ścieki Oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	1,81 x 10 ²	5	4,20 x 10 ²	1x 10 ²	2,68 x 10 ⁴	1,2 x 10 ²
	Ścieki Oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	4,5 x 10 ¹	0	1,34 x 10 ²	6	2,06 x 10 ²	1,1 x 10 ¹
7dni	Ścieki oczyszczone	5 x 10 ¹	0	2,8 x 10 ¹	0	1,1 x 10 ¹	0
	Ścieki Oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	4,6 x 10 ³	0	2,3 x 10 ⁴	5 x 10 ¹	2,8 x 10 ⁴	6,5 x 10 ¹
	Ścieki Oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	2 x 10 ²	2	1,46 x 10 ²	5	3,74 x 10 ²	4

Załącznik 20. Zmiany wartości RLU w badaniu wpływu podłoża, na którym namnażają się mikroorganizmy z biopreparatu A7, na wpływ na skuteczność usuwania bakterii z grupy coli ze ścieków oczyszczonych dla temp. 4,15 i 28°C

	próba	ATP ogólne	ATP zewnątrzkomórkowe
4°C			
0h	ścieki oczyszczone	1 129 169	43 786
24h	ścieki oczyszczone	1 117 008	41 796
	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	1 252 303	80 572
	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	1 363 575	99 501
48h	ścieki oczyszczone	730 475	55 942

	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	1 966 188	120 560
	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	1 717 055	51 209
72h	ścieki oczyszczone	789 834	25 560
	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	2 300 772	106 579
	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	1 068 021	58 153
7dni	ścieki oczyszczone	358 284	55 479
	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	15 542 602	184 010
	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	1 294 487	59 088
15°C			
0h	ścieki oczyszczone	1 129 169	43 786
24h	ścieki oczyszczone	864 462	812 826
	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	13 414 431	243 929
	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	2 100 896	112 059
48h	ścieki oczyszczone	663 104	43 992
	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	49 634 860	153 723
	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	2 211 423	118 144
72h	ścieki oczyszczone	548 959	24 489
	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	40 842 012	81 013
	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	1 274 830	70 708
7dni	ścieki oczyszczone	645 104	64 230
	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	79 372 984	4 992 246
	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	1 485 851	96 717
28°C			
0h	ścieki oczyszczone	1 129 169	43 786
24h	ścieki oczyszczone	753 763	50 037
	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	51 405 400	149 289
	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	2 311 587	62 338
48h	ścieki oczyszczone	379 362	32 065
	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	70 675 320	6 674 489

	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	1 877 343	40 046
72h	ścieki oczyszczone	859 945	16 944
	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	113 339 880	3 449 802
	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	2 646 956	79 203
7dni	ścieki oczyszczone	438 781	30 999
	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	29 532 086	751 173
	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	3 878 877	95 044

Załącznik 21. Analiza FCM. Wpływ podłoża, na którym namnażają się mikroorganizmy, na skuteczność usuwania bakterii z grupy coli ze ścieków oczyszczonych; inkubacja prób w temp. 4, 15 i 28°C;

	próba	1 Reg.	1 Reg. [%]	2 Reg.	2 Reg. [%]	3 Reg.	3 Reg. [%]
4°C							
0h	ścieki oczyszczone	219 823	40	168 793	31		
24h	ścieki oczyszczone	126 402	30	144 048	34		
24h	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	126 150	46	50 066	18		
24h	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	146 967	46	125 676	39		
48h	ścieki oczyszczone	66 106	28	90 685	39		
48h	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	139 934	45	55 779	18		
48h	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	43 503	26	58 349	34		
72h	ścieki oczyszczone	70 808	29	105 357	43		
72h	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	187 124	48	88 687	22		
72h	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	73 661	28	86 189	33		
7dni	ścieki oczyszczone	59 394	33	103 091	58	13 724	8
7dni	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	137 563	31	155 445	35	149 480	34
7dni	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	77 444	37	109 542	52	22 913	11
15°C							
0h	ścieki oczyszczone	219 823	40	168 793	31		

24h	ścieki oczyszczone	84 083	33	96 026	38		
24h	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	173 390	42	79 863	19		
24h	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	58 466	31	64 853	34		
48h	ścieki oczyszczone	48 683	24	73 547	36	10 818	5
48h	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	85 788	20	158 780	38	105 589	25
48h	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	51 499	22	88 115	37	13 757	5
72h	ścieki oczyszczone	58235	22	93310	36	26 538	10
72h	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	93 348	16	230 393	40	171 977	30
72h	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	55 757	24	87 995	33	25 820	9
7dni	ścieki oczyszczone	56 873	39	70 687	49	16 295	10
7dni	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	121 812	62	52 277	3	22 193	1
7dni	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	57 168	30	90 450	5	44 908	2
28°C							
0h	ścieki oczyszczone	219 823	40	168 793	31		
24h	ścieki oczyszczone	220 683	60	150 112	40		
24h	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	67 840	18	103 981	28		
24h	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	53 036	25	68 602	33		
48h	ścieki oczyszczone	37 819	21	60 730	33	21 320	11
48h	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	154 812	30	125 466	24	159 832	31
48h	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	41 368	21	58 659	29	3 3505	17
72h	ścieki oczyszczone	33 520	23	42 160	29	12 181	8
72h	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	157 890	37	73 387	17	116 563	27
72h	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	87 002	31	54 079	19	25 797	9
7dni	ścieki oczyszczone	25 444	59	10 632	2	7 122	2

7dni	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z podłożem)	218 730	82	23 540	1	23 862	1
7dni	ścieki oczyszczone z Biopreparatem (z wyizolowanymi mikroorganizmami)	34 647	47	18 938	3	20 285	3

Załącznik 22. Liczba paciorkowców kałowych w próbach z: EM Probiotyk, EM White Refresh i ACS ODO 1 oraz w próbie kontrolnej

	Ścieki oczyszczone	Biopreparat EM Probiotyk	Biopreparat EM White Refresh	Biopreparat ACS ODO_1
[jtk/100cm ³]				
0h	2 x 10 ³	2 x 10 ³	2 x 10 ³	2 x 10 ³
24h	2,1 x 10 ²	1 x 10 ²	1,1 x 10 ²	1,4 x 10 ²
48h	4 x 10 ¹	9 x 10 ¹	7 x 10 ¹	0
72h	3 x 10 ¹	1 x 10 ¹	0	2,4 x 10 ¹
7 dni	1 x 10 ¹	0	0	3 x 10 ¹

Załącznik 23. Liczba paciorkowców kałowych w próbach z zastosowaniem biopreparatu Bio-Trakt Plus oraz w próbie kontrolnej

	Ścieki oczyszczone	1 cm ³	5 cm ³	10 cm ³
[jtk/100cm ³]				
Seria 1	5 x 10 ¹	9 x 10 ¹	9 x 10 ¹	29 x 10 ¹
Seria 2	3	3 x 10 ¹	4 x 10 ¹	42 x 10 ¹

Załącznik 24a. Wyniki badań metodą PCR na obecność bakterii z grupy *coli* w ściekach oczyszczonych z dodatkiem biopreparatów;

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Procent [%]
oteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Malikia	43,28248
Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Cytophagaceae	Arcicella	0,096108
Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium	1,868092
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	4,128624
Actinobacteria	Actinobacteria	Mycobacteriales	Mycobacteriaceae	Mycobacterium	13,59122
Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Cytophagaceae	Emticicia	0,450505
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Cypionkella	4,655214
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Polynucleobacter	0,730819
Campilobacterota	Campylobacteria	Campylobacterales	Arcobacteraceae	Pseudarcobacter	0,052058
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnohabitans	0,656736
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	6,29505
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Acidovorax	0,052058
Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	Aurantimicrobium	0,040045
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Reyranellaceae	Reyranella	2,39268
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Zoogloeaceae	Zoogloea	0,416466
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Simplicispira	0,124139
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	Clostridium sensu stricto	0,326366
Actinobacteria	Actinobacteria	Mycobacteriales	Nocardiaceae	Rhodococcus	2,464761
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	Xanthobacter	0,066074
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingorhabdus	0,754845
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Chromatiaceae	Rheinheimera	0,076085
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Romboutsia	0,844946
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Boseaceae	Bosea	0,110123
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingobium	0,266298
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Hydrogenophaga	0,212238
Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Cytophagaceae	Dyadobacter	0,102114
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	Brevundimonas	0,354397
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	Caulobacter	0,254285
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Undibacterium	0,03604
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Legionellales	Legionellaceae	Legionella	0,668749
Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Pedobacter	0,222249
Bacteroidetes	Saprospira	Saprospirales	Lewinellaceae	Haliscomenobacter	0,192215

Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Janthinobacterium	0,08009
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	Ancylobacter	0,068076
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	0,140157
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellvibrionales	Cellvibrionaceae	Cellvibrio	0,046052
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Devosiaceae	Devosia	0,112126
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	Phenylobacterium	0,140157
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Nevskiales	Nevskiaceae	Nevskia	0,334374
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Pseudorhodofera	0,060067
Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Daejeonella	0,020022
Actinobacteria	Actinobacteria	Propionibacteriales	Nocardoidaceae	Nocardioides	0,142159
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Zoogloeaceae	Thauera	0,118132
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Sterolibacteriaceae	Methyloversatilis	0,132148
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	0,076085
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Inhella	0,028031
Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Cytophagaceae	Lacihabitans	0,056063
Actinobacteria	Actinobacteria	Propionibacteriales	Nocardoidaceae	Aeromicrobium	0,200224
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Aquabacterium	0,09811
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Rhizobacter	0,136152
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	Rugosibacter	0,088099
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	Insolitipirillum	0,030034
Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Cryomorphaceae	Fluviicola	0,090101
Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Intrasporangiaceae	Ornithinibacter	0,064072
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Hyphomonadaceae	Asprobacter	0,08009
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Thiotrichaceae	Thiothrix	0,048054
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingopyxis	0,046052
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Methylibium	0,044049
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Intestinibacter	0,040045
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Rhodanobacteraceae	Dokdonella	0,03604
Actinobacteria	Actinobacteria	Mycobacteriales	Gordoniaceae	Gordonia	0,034038

Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	Roseomonas	0,020022
----------------	---------------------	------------------	------------------	------------	----------

Załącznik 24b. Wyniki badań metodą PCR na obecność bakterii z grupy coli w ściekach oczyszczonych z dodatkiem biopreparatów

phylum	class	order	family	genus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Malikia	43,28 248	0	0,09 575 2	0,04 754 8	3,09 842	7,80 283 8	5,66 425 7	5,48 321 1	27,8 337 6	13,9 693 5	49,3 847 2	22,1 369 5
Proteobacteria	Betaproteobacteria	unclassified	unclassified	unclassified	0,202 226	1,25 289 3	1,85 236 8	1,51 774 5	35,9 234 5	14,3 896 1	20,2 471 8	18,0 194 8	7,90 269 3	23,0 460 4	1,30 284 1	5,59 229 8
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae	Solibacillus	0	0	36,1 142 1	47,1 090 6	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteroidetes	Cytophagata	Cytophagales	Cytophagaceae	Arcicella	0,096 108	0	0	0	17,3 936 8	24,0 563	11,5 540 2	18,0 014 8	0,03 829 4	6,52 104 3	0	0,37 989 5
Campylobacterota	Campylobacterota	Campylobacterales	Arcobacteraceae	Aliarcobacter	0	54,9 533 2	0,20 717 3	0,50 401 3	0,79 991 9	0,37 394 7	0,17 465 9	0,19 117	0,07 457 3	0,03 580 9	0	0
Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium	1,868 092	0,04 309 3	0	0	2,27 825	2,15 535	2,31 036 2	2,45 372 6	18,5 303 1	22,4 731	20,1 882 8	19,5 053 7
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	4,128 624	7,56 843	0	0	7,32 887 8	12,0 237 3	10,8 576	7,84 022 7	7,74 951 6	4,23 113 9	3,27 106 6	6,39 053 8
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae	Lysinibacillus	0	0	32,4 129 5	23,0 571 7	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	unclassified	0	0,11 810 7	0	0	14,9 858 2	0,01 913 9	8,90 981 8	0,67 246 9	5,45 791 7	0,15 643	0,03 614 4	0,02 307 1
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	Aeromonas	0	0	0,09 401 1	0,05 325 4	0,51 640 3	4,47 853 5	9,09 774 3	13,2 424 7	10,1 015 8	6,18 745 2	0,26 615 4	14,3 206 5

Actinobacteria	Actinobacteria	Mycobacteriales	Mycobacteriaceae	Mycobacterium	13,59122	0	0	0	0,919401	0,850951	1,587407	0,330612	0,078604	0,544677	0,072289	0,109201
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Planococcaeae	unclassified	0	0	6,389276	8,239187	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteroidetes	Cytophagata	Cytophagales	Cytophagaceae	Emticicia	0,450505	0	0,022632	0	0,020251	0	0	0,053977	1,737343	0	1,368558	8,094681
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Cypionkella	4,655214	0	0	0	0,074929	0,08539	0,221087	0,220408	0,562319	2,163629	6,062398	1,916392
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Polynucleobacter	0,730819	0,025537	0	0	1,958283	0,709617	0,930778	4,612824	0,415189	2,335136	0,594739	0,699806
Campylobacterota	Campylobacterota	Campylobacteriales	Arcobacteraceae	Pseudarcobacter	0,052058	0,046285	0	0	2,527339	5,286791	9,391789	6,094955	0,775959	1,487024	0,034501	0,498324
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacteriales	Syntrophaceae	unclassified	0	4,700343	2,428621	0,513523	0,068854	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Rhizobium	0	0	0	0	1,729445	5,060067	4,510181	0,688213	0,030232	1,176049	0,082146	0,072288
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	unclassified	0,444498	1,174687	0	0	2,045362	0,574171	1,552033	5,123361	0,620767	1,669839	2,707543	0,815159
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Sterolibacteriaceae	Sulfuritalea	0	6,34267	5,454387	3,619385	0,042527	0,017667	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	unclassified	1,157296	7,313064	6,06546	6,54266	1,761847	3,540722	2,818863	6,322111	5,643341	2,276711	3,530649	3,997355

Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnohabitans	0,656 736	0	0	0	0,06 885 4	0,02 502 8	1,06 121 9	0,11 020 4	1,06 014 2	1,90 919 5	0,39 101 6	0,80 746 9	
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	6,295 05	4,78 812 5	0	0	0,50 830 3	0,50 939 3	1,66 478 7	0,46 330 7	0,76 991 3	1,25 897 6	0,28 915 5	0,60 752 4	
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Paludibacteraceae	Paludibacter	0	0	0	0	0,48 602 7	0,81 856 2	0,53 061	0,53 977 5	1,32 215 4	1,77 915 2	0,21 029 5	0,37 989 5	
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Acidovorax	0,052 058	0,06 065	0	0	0,68 853 8	2,16 123 9	0,67 431 6	0,48 804 6	0,45 751 4	0,20 543 2	0,43 209	0,63 367 1	
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	unclassified	unclassified	unclassified	3,075 444	0	0	0	0,11 745 6	0,14 722 3	0,21 224 4	0,20 466 5	0,08 666 6	0,08 858 1	0,08 543 2	0,23 993 4	
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	unclassified	0,238 267	0	0,01 915	0,03 043 1	0	0,06 330 6	0	0,84 564 7	1,31 610 8	0	1,32 912 7	0,67 673 6	
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Anaerocella	0	1,41 409 3	0,58 669 9	1,63 186 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Neisseriales	Chromobacteriaceae	Vogesella	0	0	0	0	0,14 378 3	0,13 250 1	0,26 751 6	0,76 243 2	1,24 758 1	0,11 308 2	0,16 100 7	1,21 043 4	
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	unclassified	0	0	0	0	0,16 403 4	0,23 555 7	0,61 683 4	0,76 693	0,48 976 1	0,10 177 3	0,08 214 6	2,25 168 4	
Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	Aurantimicrobium	0,040 045	0	0	0	0	0,02 944 5	0	1,60 583	0,22 371 8	0,34 489 9	1,04 325 8	0,21 532 5	
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Reyranellaceae	Reyranella	2,392 68	0	0	0	0,11 543 1	0,05 888 9	0,10 391 1	0,08 321 5	0,06 651 1	0,05 088 7	0,23 493 8	0,07 382 6	

Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	unclassified	2,342 624	0,06 224 6	0,02 611 4	0,03 423 5	0	0	0,04 200 7	0,29 012 9	0,36 681 7	0	0,11 993 4	0,07 690 2
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Zoogloeaceae	Zoogloea	0,416 466	0	0	0	0,45 565	1,52 376 2	0,89 982 5	0,44 981 2	0,37 286 4	0,28 647 4	0,47 152	0,24 147 2
Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Weeksellaceae	Cloacibacterium	0	0	0	0	0,05 265 3	0,17 225 1	0	0	0,03 224 8	1,54 733 4	0,52 737 9	0,06 613 6
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Simplicispira	0,124 139	0,66 235 7	0,96 100 3	1,18 490 6	0,04 050 2	0,05 741 7	0,05 748 3	0	0,04 031	0	0,03 943	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Comamonas	0	2,83 935 8	0,13 057 1	0,08 939 1	0,06 682 9	0,02 797 2	0	0	0,02 418 6	0	0,07 228 9	0,07 690 2
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Macellibacteroides	0	0,25 696 3	0,26 810 6	0,17 878 2	0	0,71 992 2	0	0,13 269 5	0,07 054 2	0	0,07 393 2	0,09 535 8
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides	0	0,19 631 3	0	0,02 662 7	0,02 835 2	0,82 297 9	0	0,06 972 1	0,02 217 3	0,10 177 3	0,07 064 6	0,03 537 5
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae 1	Clostridium sensu stricto	0,326 366	0	0	0	0,03 240 2	1,36 623 3	0	0,04 723	0	0,03 015 5	0	0
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Acetoanaerobium	0	0,31 442	0,60 062 7	0,54 585 6	0	0	0	0	0	0	0	0
Actinobacteria	Actinobacteria	Mycobacteriales	Nocardiaceae	Rhodococcus	2,464 761	0	0	0	0	0	0	0,17 767 6	0,10 682	0	0,15 772 1	0,05 383 1
Actinobacteria	Actinobacteria	unclassified	unclassified	unclassified	1,187 33	0,47 242 8	0,75 731 2	0,69 040 3	0,04 860 3	0,06 625 1	0,05 748 3	0,07 421 9	0,05 643 3	0,04 334 8	0,05 093 1	0,02 768 5

Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Dysgonomonadaceae	Petrimonas	0	0,27 611 5	0,78 342 6	0,31 762 3	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacteriales	Syntrophaceae	Smithella	0	0,45 487 2	0,70 334 3	0,29 099 6	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	unclassified	0	0	0	0	0	3,96 472 5	0,24 098 5	0,43 856 7	0,21 364 1	0,10 742 8	0,08 214 6	2,26 552 6
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Azonexaceae	unclassified	0,350 392	0,33 038 1	0,78 168 5	0,76 648	0,02 430 1	0,11 630 6	0,15 033 9	0,11 020 4	0,13 100 6	0,02 261 6	0,02 300 1	0,02 922 3
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	unclassified	0,080 09	0	0	0	0,23 896 3	0,25 028	0,37 805 9	0,08 771 3	0	0,22 427 9	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	Xanthobacter	0,066 074	0	0	0	0,40 299 7	0,30 622 5	0,20 118 9	0,16 643 1	0	0,03 204	0	0,02 768 5
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingorhabdus	0,754 845	0	0	0	0,03 037 7	0,05 594 5	0,05 527 2	0,06 747 2	0,07 255 7	0,02 073 2	0,05 750 2	0,04 767 9
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Chromatiaceae	Rheinheimera	0,076 085	0	0	0	0,13 163 2	0,43 136 4	0,28 741 4	0,35 760 1	0,38 697 2	0,84 245 8	0,29 572 7	0,24 147 2
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacteriales	Rhodobacteraceae	Gemmobacter	0	0	0	0	0,20 858 6	0	0,07 295 9	0,06 297 4	0,08 868 1	0	0,58 323 9	0
Bacteroidetes	Chitinophagia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	unclassified	0,935 047	0	0	0	0,30 376 7	0,03 238 9	0,26 088 3	0,12 819 6	0,17 131 6	0,13 569 8	0,68 674 3	0,21 686 3
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Neisseriales	Chromobacteriaceae	Aquaspirillum	0	0	0	0	0,26 934	0,21 936 3	0,08 180 2	0,05 622 7	0,48 976 1	0,08 292 7	0,02 628 7	0,02 768 5

Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Romboutsia	0,844 946	0	0	0	0,04 050 2	0,03 533 4	0,05 085	0,02 474	0,03 023 2	0	0,01 807 2	0,01 538
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	unclassified	unclassified	0,088 099	0	0	0	0,06 075 3	0,38 572 5	0,20 118 9	0,15 743 4	0,06 852 6	0,11 119 7	0,03 450 1	0,17 995
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Giesbergeria	0	0	0	0	0,44 147 4	0	0,46 870 5	0	0,04 031 6	0,05 465 6	0,02 793	0
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiales_Incertae_Sedis_XII	Fusibacter	0	0,07 661	0,04 352 4	0,02 852 9	0,29 364 1	0,17 372 4	0,11 275 5	0,11 020 4	0,30 836 8	0,31 474 4	0,06 407 4	0,06 305 9
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Boseaceae	Bosea	0,110 123	0	0	0,03 233 3	0,03 442 7	0,05 3	0	0,12 144 9	0,19 953 2	0	0,50 437 8	0,10 458 6
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Shewanellaceae	Shewanella	0	0	0	0	0,03 037 7	0,48 289 3	0,02 432	0,03 598 5	0,02 418 6	0,01 884 7	0,09 200 4	0,09 997 2
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingobium	0,266 298	0	0	0	0,04 050 2	0,06 330 6	0	0	0,13 100 6	0,73 691 6	0,01 642 9	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Hydrogenophaga	0,212 238	0	0	0	0,12 150 7	0	0,03 316 3	0,24 065	0,23 782 7	0	0,29 901 3	0,15 534 2
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	Tolomonas	0	0	0	0	0	0	0,17 023 7	0,18 442 3	0,36 077 1	0,10 931 2	0	0,85 514 8
Bacteroidetes	Cytophagata	Cytophagales	Cytophagaceae	Dyadobacter	0,102 114	0	0	0	0	0	0	0	0,08 666 6	0	0,65 717 1	0,74 748 5
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	unclassified	0	0,07 820 6	0	0	0	0,52 117 1	0	0	0	0,04 711 7	0	0

Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococaceae	unclassified	0	0,523502	0,245474	0,298604	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Sterolibacteriaceae	unclassified	0	0,458064	0,44046	0,319525	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	Brevundimonas	0,354397	0,039901	0	0	0,133657	0,163418	0,097278	0,044981	0,298291	0,079157	0,062431	0,050755
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	Caulobacter	0,254285	0	0	0	0,020251	0,067723	0,066326	0,089962	0,143099	0,022616	0,072289	0,103048
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	unclassified	unclassified	0	0	0	0	0	0,353336	0	0,031487	0	0	0	0,067674
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiales_Incertae_Sedis_XIII	unclassified	0	0,282499	0,052228	0,140743	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Undibacterium	0,03604	0	0	0	0,060753	0,150168	0,234353	0,105706	0,08465	0	0	0,046141
Actinobacteria	Actinobacteria	Mycobacteriales	unclassified	unclassified	0,324363	0	0	0	0	0	0,033163	0,044981	0,02027	0,02827	0,031216	0,029223
Proteobacteria	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	0	0,033517	0	0	0	0,197279	0	0	0	0,022616	0,026287	0,136885
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Devosiaceae	unclassified	0,038043	0	0	0	0,076954	0,114834	0,119387	0,049479	0	0,090465	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Legionellales	Legionellaceae	Legionella	0,668749	0	0	0,020921	0	0	0,02653	0	0	0	0	0,038451

Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Curvibacter	0	0	0	0	0,034427	0	0	0	0	0	0,292441	0,158418
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Azospirillaceae	Azospirillum	0	0	0	0	0,060753	0,09864	0	0	0,026201	0	0,093647	0,476791
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiales_Incertae_Sedis XI	Sedimentibacter	0	0,260155	0,083565	0,17688	0	0	0	0	0	0	0	0
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Tissierellaceae	Tissierella	0	0,228234	0	0,193997	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Azonexaceae	Ferribacterium	0	0	0	0	0,056703	0,088334	0,134863	0,060725	0	0,075388	0,046002	0
Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	unclassified	0,228256	0	0	0	0	0,032389	0	0,040483	0,048371	0	0,073932	0,029223
Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	unclassified	unclassified	0	0,09257	0,217618	0,171174	0	0	0	0	0	0	0	0
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae 1	Paenibacillus	0	0	0,524025	0	0	0,050056	0	0,260891	0	0,280819	0	0
Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Pedobacter	0,222249	0	0	0	0,074929	0,0265	0,039796	0	0	0,045233	0,532308	0
Bacteroidetes	Saprospiria	Saprospirales	Lewinellaceae	Haliscomenobacter	0,192215	0	0	0	0	0	0	0	0,052402	0	0,057502	0,066136
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Dysgonomonadaceae	unclassified	0	0,142048	0,156685	0,05896	0	0	0	0	0	0	0	0

Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Janthinobacterium	0,08009	0	0	0	0,097205	0,213474	0,132652	0	0,030232	0,03204	0	0,158418
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Azonexaceae	Dechloromonas	0	0,06065	0,100975	0,16737	0	0,029445	0	0	0	0	0	0
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	unclassified	0	0,110127	0,167131	0,260565	0	0,03975	0	0,083215	0	0,082927	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	Ancylobacter	0,068076	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,088718	0,124581
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	0,140157	0,248983	0	0	0	0	0	0	0,030232	0	0,021358	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Polaromonas	0	0,075014	0,067897	0,133136	0	0	0	0	0,026201	0	0,031216	0,039989
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellvibrionales	Cellvibrionaceae	Cellvibrio	0,046052	0	0	0	0	0,027972	0,030952	0	0,100774	0	0	0,059983
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Devosiaceae	Devosia	0,112126	0	0	0	0	0,0265	0	0	0,052402	0	0,042716	0,064597
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Brucellaceae	Pseudochrobactrum	0	0,114915	0,047006	0,020921	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Pseudoduganella	0	0	0	0	0	0	0	0,031487	0	0	0	0,132271
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Nitrosomonadaceae	unclassified	0,216242	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	unclassified	unclassified	unclassified	0,168188	0,057458	0,102716	0,022823	0	0,017667	0	0	0	0	0	0

Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Syntrophomonadaceae	Syntrophomonas	0	0,073418	0,069638	0,112214	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	Novispirillum	0	0	0	0	0	0,055945	0	0,029238	0,024186	0	0	0,055369
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	Pseudochelatococcus	0	0,031921	0,081825	0,05896	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Kaistiaceae	Kaistia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,121577	0,029223
Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Intrasporangiaceae	unclassified	0	0	0,074861	0,093195	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobibrionales	Desulfomicrobiaceae	Desulfomicrobium	0	0,059054	0,043524	0,053254	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	unclassified	0,136152	0	0	0	0	0,017667	0	0	0	0	0,016429	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Chelatococcaceae	Camelimonas	0	0	0,069638	0,070372		0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Agrobacterium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,129195
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Melaminivora	0	0,110127	0	0,026627	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Sterolibacteriaceae	Sterolibacterium	0	0,087782	0,01915	0,032333	0	0	0	0	0	0	0	0

Proteobacteria	Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	Rivicola	0	0	0	0	0	0,03975	0	0,040483	0,038294	0	0,018072	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacteriales	Caulobacteraceae	Phenylobacterium	0,140157	0,047881	0,017409	0	0	0,014722	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	unclassified	0	0	0	0	0	0	0	0	0,046356	0	0	0,196869
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Parabacteroides	0	0,054265	0,07312	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Nevskiales	Nevskiaceae	Nevskia	0,334374	0	0	0	0	0	0,02653	0,087713	0,06248	0	0	0,023071
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Pseudorhodoferrax	0,060067	0	0	0	0	0,063306	0	0	0	0	0	0
Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Daejeonella	0,020022	0,09257	0	0,022823	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobibrionales	Desulfovibrionaceae	Desulfovibrio	0	0,130875	0,081825	0,142645	0	0	0	0	0	0	0	0
Actinobacteria	Actinobacteria	Propionibacteriales	Nocardioideaceae	Nocardioides	0,142159	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Zoogloeaceae	Thauera	0,118132	0,017556	0	0	0,040502	0,022084	0,035374	0	0,02217	0,035809	0,047645	0,021532
Cloacimonetes	unclassified	unclassified	unclassified	Candidatus Cloacamonas	0	0,033517	0,031337	0,057058	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Raoultella	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,104586

Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Sterolibacteriaceae	Methyloversatilis	0,132148	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Zoogloeaceae	unclassified	0,130146	0	0	0	0	0,058889	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Citrobacter	0	0	0	0	0	0,075084	0	0	0	0	0	0,018456
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	unclassified	unclassified	0	0,047881	0,064415	0,039941	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	0,076085	0	0	0	0	0,017667	0	0	0,028217	0	0	0
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Proteocatella	0	0,06863	0	0,030431	0	0	0	0	0	0	0	0
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Anaerotaenia	0	0	0	0	0	0,055945	0	0,04723	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Inhella	0,028031	0	0	0	0	0,017667	0,02653	0	0	0	0	0
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lentilactobacillus	0	0	0	0	0,066829	0	0,103911	0	0	0,056541	0	0
Campylobacterota	Campylobacteria	Campylobacteriales	Arcobacteraceae	unclassified	0,020022	0,070226	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteroidetes	Cytophagata	Cytophagales	Cytophagaceae	Flectobacillus	0	0	0	0	0	0	0,02432	0	0	0	0	0,083054
Bacteroidetes	Cytophagata	Cytophagales	Cytophagaceae	Lacihabitans	0,056063	0	0	0	0,020251	0,036806	0	0	0	0	0	0

Proteobacteria	Gamma proteobacteria	Enterobacteriales	Pectobacteriaceae	unclassified	0	0	0	0	0	0,129557	0	0	0	0	0	0
Actinobacteria	Actinobacteria	Propionibacteriales	Nocardioidaceae	Aeromicrobium	0,200224	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Aquabacterium	0,09811	0	0	0	0	0	0,028741	0	0	0	0,021358	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Rhizobacter	0,136152	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Pleomorphomonadaceae	Pleomorphomonas	0	0	0	0	0	0,027972	0	0,038234	0	0,026386	0	0
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	unclassified	unclassified	0	0,046285	0,020891	0,022823	0	0	0	0	0	0,056541	0	0
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	unclassified	unclassified	unclassified		0,030325	0,038301	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Cryomorphaceae	unclassified	0,070078	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	unclassified	0	0	0	0	0	0,067723	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	Rugosibacter	0,088099	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Gamma proteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Azomonas	0	0	0	0	0,070879	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	Insolitospirillum	0,030034	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,023071
Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Cryomorphaceae	Fluviicola	0,090101	0	0	0	0,022276	0	0,033163	0	0,048371	0	0	0

Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	Pseudomonas	0	0	0	0	0	0	0	0,07197	0	0	0	0,027685
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	Trichococcus	0	0	0	0,020921	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	Aquabacter	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,059145	0
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Acetobacterium	0	0,031921	0,022632	0,030431	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	Phytobacter	0	0	0	0	0	0,053	0	0	0	0	0	0
Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Intrasporangiaceae	Ornithinibacter	0,064072	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteroidetes	Cytophagata	Cytophagales	Cytophagaceae	Spirosoma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,031216	0,019994
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Azonexaceae	Azonexus	0	0	0	0	0	0,014722	0	0	0	0	0	0,029223
Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	unclassified	0	0,046285	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Campylobacterota	Campylobacterota	Campylobacterales	Sulfurospirillaceae	Sulfurospirillum	0	0	0	0	0	0,014722	0	0,029238	0	0	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Chromatiaceae	unclassified	0	0	0	0	0	0	0	0	0,058449	0	0	0
Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	Leucobacter	0	0,044689	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Methylophilaceae	Methylobacillus	0	0,044689	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Tissierellaceae	unclassified	0	0,038305	0	0,051352	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacteriales	Hyphomonadaceae	Asprobacter	0,08009	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Oligoflexia	Bacteriovorales	Bacteriovoraceae	Bacteriovorax	0	0,020749	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Pseudacidovorax	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,049002	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Thiotrichaceae	Thiothrix	0,048054	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Actinobacteria	Thermoleophilia	Solirubrobacterales	unclassified	unclassified	0	0,023941	0,024373	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingopyxis	0,046052	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfurimonadales	unclassified	unclassified	0	0,01596	0,038301	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Methylibium	0,044049	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	unclassified	0,052058	0	0,05571	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Candidatus Saccharibacteria	unclassified	unclassified	unclassified	Saccharibacteria_genera_incertae_sedis	0,028031	0,020749	0,052228	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	Elstera	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,027685
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Intestinibacter	0,040045	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Alcaligenes	0	0,06065	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	unclassified	0,038043	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Klebsiella	0	0	0	0	0	0,023556	0	0	0	0	0	0,029223
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Rhodanobacteraceae	Dokdonella	0,03604	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	unclassified	unclassified	0,028031	0	0,024373	0,036137	0	0	0	0	0	0	0	0
Actinobacteria	Actinobacteria	Mycobacteriales	Gordoniaceae	Gordonia	0,034038	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lacticaseibacillus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,020732	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	unclassified	unclassified	0	0	0,01915	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Ancalomicrobiaceae	Pinisolibacter	0	0	0	0	0	0,022084	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellvibrionales	Haliaceae	unclassified	0,028031	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Dysgonomonadaceae	Dysgonomonas	0	0,020749	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Dysgonomonadaceae	Fermentimonas	0	0,020749	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Brucellaceae	Paenochrobactrum	0	0,020749	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Variovorax	0	0	0	0	0	0,019139	0	0	0	0	0	0
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminiclostridium	0	0,019153	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	unclassified	0	0	0,034819	0,022823	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Macromonas	0	0	0	0	0	0	0	0	0,024186	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylocystaceae	unclassified	0	0	0,01915	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Ideonella	0	0	0,01915	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	Roseomonas	0,020022	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	unclassified	unclassified	0	0	0	0,019019	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Hyphomicrobium	0	0	0	0,019019	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	unclassified	0	0,019153	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Załącznik 24c. Wyniki badań metodą PCR na obecność bakterii z grupy coli w ściekach oczyszczonych z dodatkiem biopreparatów [%]

phylum	class	order	family	genus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Malikia	216 17	0	55	25	153 0	530 0	256 2	243 8	138 10	741 2	300 59	143 93
Proteobacteria	Betaproteobacteria	unclassified	unclassified	unclassified	101	785	106 4	798	177 39	977 4	915 8	801 2	392 1	122 28	793	363 6
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae	Solibacillus	0	0	207 44	247 69	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Cytophagaceae	Arcicella	48	0	0	0	858 9	163 40	522 6	800 4	19	346 0	0	247
Campilobacterota	Campylobacteria	Campylobacteriales	Arcobacteraceae	Aliarcobacter	0	344 31	119	265	395	254	79	85	37	19	0	0
Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium	933	27	0	0	112 5	146 4	104 5	109 1	919 4	119 24	122 88	126 82
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	206 2	474 2	0	0	361 9	816 7	491 1	348 6	384 5	224 5	199 1	415 5
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae	Lysinibacillus	0	0	186 18	121 23	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	unclassified	0	74	0	0	740 0	13	403 0	299	270 8	83	22	15
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	Aeromonas	0	0	54	28	255	304 2	411 5	588 8	501 2	328 3	162	931 1
Actinobacteria	Actinobacteria	Mycobacteriales	Mycobacteriaceae	Mycobacterium	678 8	0	0	0	454	578	718	147	39	289	44	71
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae	unclassified	0	0	367 0	433 2	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Cytophagaceae	Emticicia	225	0	13	0	10	0	0	24	862	0	833	526 3
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Cypionkella	232 5	0	0	0	37	58	100	98	279	114 8	369 0	124 6

Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Polynucleobacter	365	16	0	0	967	482	421	2051	206	1239	362	455
Campilobacterota	Campylobacteria	Campylobacteriales	Arcobacteraceae	Pseudarcobacter	26	29	0	0	1248	3591	4248	2710	385	789	21	324
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacteriales	Syntrophaceae	unclassified	0	2945	1395	270	34	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Rhizobium	0	0	0	0	854	3437	2040	306	15	624	50	47
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	unclassified	222	736	0	0	1010	390	702	2278	308	886	1648	530
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Sterolibacteriaceae	Sulfuritalea	0	3974	3133	1903	21	12	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	unclassified	578	4582	3484	3440	870	2405	1275	2811	2800	1208	2149	2599
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnohabitans	328	0	0	0	34	17	480	49	526	1013	238	525
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	3144	3000	0	0	251	346	753	206	382	668	176	395
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Paludibacteraceae	Paludibacter	0	0	0	0	240	556	240	240	656	944	128	247
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Acidovorax	26	38	0	0	340	1468	305	217	227	109	263	412
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	unclassified	unclassified	unclassified	1536	0	0	0	58	100	96	91	43	47	52	156
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	unclassified	119	0	11	16	0	43	0	376	653	0	809	440
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Anaerocella	0	886	337	858	0	0	0	0	0	0	0	0

Proteobacteria	Betaproteobacteria	Neisseriales	Chromobacteriaceae	Vogesella	0	0	0	0	71	90	121	339	619	60	98	787
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	unclassified	0	0	0	0	81	160	279	341	243	54	50	1464
Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	Aurantimicrobium	20	0	0	0	0	20	0	714	111	183	635	140
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Reyranellaceae	Reyranella	1195	0	0	0	57	40	47	37	33	27	143	48
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	unclassified	1170	39	15	18	0	0	19	129	182	0	73	50
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Zoogloeaceae	Zoogloea	208	0	0	0	225	1035	407	200	185	152	287	157
Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Weeksellaceae	Cloacibacterium	0	0	0	0	26	117	0	0	16	821	321	43
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Simplicispira	62	415	552	623	20	39	26	0	20	0	24	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Comamonas	0	1779	75	47	33	19	0	0	12	0	44	50
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Macellibacteroides	0	161	154	94	0	489	0	59	35	0	45	62
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides	0	123	0	14	14	559	0	31	11	54	43	23
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae 1	Clostridium sensu stricto	163	0	0	0	16	928	0	21	0	16	0	0
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Acetoanaerobium	0	197	345	287	0	0	0	0	0	0	0	0
Actinobacteria	Actinobacteria	Mycobacteriales	Nocardiaceae	Rhodococcus	1231	0	0	0	0	0	0	79	53	0	96	35
Actinobacteria	Actinobacteria	unclassified	unclassified	unclassified	593	296	435	363	24	45	26	33	28	23	31	18
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Dysgonomonadaceae	Petrimonas	0	173	450	167	0	0	0	0	0	0	0	0

Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacteriales	Syntrophaceae	Smithella	0	285	404	153	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	unclassified	0	0	0	0	0	2693	109	195	106	57	50	1473
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Azonexaceae	unclassified	175	207	449	403	12	79	68	49	65	12	14	19
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	unclassified	40	0	0	0	118	170	171	39	0	119	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	Xanthobacter	33	0	0	0	199	208	91	74	0	17	0	18
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingorhabdus	377	0	0	0	15	38	25	30	36	11	35	31
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Chromatiaceae	Rheinheimera	38	0	0	0	65	293	130	159	192	447	180	157
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacteriales	Rhodobacteraceae	Gemmobacter	0	0	0	0	103	0	33	28	44	0	355	0
Bacteroidetes	Chitinophagia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	unclassified	467	0	0	0	150	22	118	57	85	72	418	141
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Neisseriales	Chromobacteriaceae	Aquaspirillum	0	0	0	0	133	149	37	25	243	44	16	18
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Romboutsia	422	0	0	0	20	24	23	11	15	0	11	10
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	unclassified	unclassified	44	0	0	0	30	262	91	70	34	59	21	117
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Giesbergeria	0	0	0	0	218	0	212	0	20	29	17	0

Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiales_Incertae Sedis XII	Fusibacter	0	48	25	15	145	118	51	49	153	167	39	41
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Boseaceae	Bosea	55	0	0	17	17	36	0	54	99	0	307	68
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Shewanellaceae	Shewanella	0	0	0	0	15	328	11	16	12	10	56	65
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingobium	133	0	0	0	20	43	0	0	65	391	10	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Hydrogenophaga	106	0	0	0	60	0	15	107	118	0	182	101
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	Tolumonas	0	0	0	0	0	0	77	82	179	58	0	556
Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Cytophagaceae	Dyadobacter	51	0	0	0	0	0	0	0	43	0	400	486
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	unclassified	0	49	0	0	0	354	0	0	0	25	0	0
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	unclassified	0	328	141	157	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Sterolibacteriaceae	unclassified	0	287	253	168	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	Brevundimonas	177	25	0	0	66	111	44	20	148	42	38	33
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	Caulobacter	127	0	0	0	10	46	30	40	71	12	44	67
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	unclassified	unclassified	0	0	0	0	0	240	0	14	0	0	0	44

Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiales_Incertae Sedis XIII	unclassified	0	177	30	74	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Undibacterium	18	0	0	0	30	102	106	47	42	0	0	30
Actinobacteria	Actinobacteria	Mycobacteriales	unclassified	unclassified	162	0	0	0	0	0	15	20	14	15	19	19
Proteobacteria	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	0	21	0	0	0	134	0	0	0	12	16	89
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Devosiaceae	unclassified	19	0	0	0	38	78	54	22	0	48	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Legionellales	Legionellaceae	Legionella	334	0	0	11	0	0	12	0	0	0	0	25
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Curvibacter	0	0	0	0	17	0	0	0	0	0	178	103
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Azospirillaceae	Azospirillum	0	0	0	0	30	67	0	0	13	0	57	310
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiales_Incertae Sedis XI	Sedimentibacter	0	163	48	93	0	0	0	0	0	0	0	0
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Tissierellaceae	Tissierella	0	143	0	102	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Azonexaceae	Ferribacterium	0	0	0	0	28	60	61	27	0	40	28	0
Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	unclassified	114	0	0	0	0	22	0	18	24	0	45	19
Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	unclassified	unclassified	0	58	125	90	0	0	0	0	0	0	0	0
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae 1	Paenibacillus	0	0	301	0	0	34	0	116	0	149	0	0

Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Pedobacter	111	0	0	0	37	18	18	0	0	24	324	0
Bacteroidetes	Saprosiria	Saprosirales	Lewinellaceae	Halicomenobacter	96	0	0	0	0	0	0	0	26	0	35	43
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Dysgonomonadaceae	unclassified	0	89	90	31	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Janthinobacterium	40	0	0	0	48	145	60	0	15	17	0	103
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Azonexaceae	Dechloromonas	0	38	58	88	0	20	0	0	0	0	0	0
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	unclassified	0	69	96	137	0	27	0	37	0	44	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	Ancylobacter	34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	54	81
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	70	156	0	0	0	0	0	0	15	0	13	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Polaromonas	0	47	39	70	0	0	0	0	13	0	19	26
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellvibrionales	Cellvibrionaceae	Cellvibrio	23	0	0	0	0	19	14	0	50	0	0	39
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Devosiaceae	Devosia	56	0	0	0	0	18	0	0	26	0	26	42
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Brucellaceae	Pseudochrobactrum	0	72	27	11	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Pseudoduganella	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	0	86
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Nitrosomonadaceae	unclassified	108	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Proteobacteria	Alphaproteobacteria	unclassified	unclassified	unclassified	84	36	59	12	0	12	0	0	0	0	0	0
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Syntrophomonadaceae	Syntrophomonas	0	46	40	59	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	Novispirillum	0	0	0	0	0	38	0	13	12	0	0	36
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	Pseudochelatococcus	0	20	47	31	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Kaistiaceae	Kaistia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	74	19
Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Intrasporangiaceae	unclassified	0	0	43	49	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobibrionales	Desulfomicrobiaceae	Desulfomicrobium	0	37	25	28	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	unclassified	68	0	0	0	0	12	0	0	0	0	10	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Chelatococcaeae	Camelimonas	0	0	40	37	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Agrobacterium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	84
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Melaminivora	0	69	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Sterolibacteriaceae	Sterolibacterium	0	55	11	17	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	Rivicola	0	0	0	0	0	27	0	18	19	0	11	0

Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	Phenylobacterium	70	30	10	0	0	10	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	unclassified	0	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	128
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Parabacteroides	0	34	42	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Nevskiales	Nevskiaceae	Nevskia	167	0	0	0	0	0	12	39	31	0	0	15
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Pseudorhodoferrax	30	0	0	0	0	43	0	0	0	0	0	0
Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Daejeonella	10	58	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	Desulfovibrio	0	82	47	75	0	0	0	0	0	0	0	0
Actinobacteria	Actinobacteria	Propionibacteriales	Nocardioidaceae	Nocardioides	71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Zoogloeaceae	Thauera	59	11	0	0	20	15	16	0	11	19	29	14
Cloacimones	unclassified	unclassified	unclassified	Candidatus Cloacamonas	0	21	18	30	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Raoultella	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	68
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Sterolibacteriaceae	Methyloversatilis	66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Zoogloeaceae	unclassified	65	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0	0

Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Citrobacter	0	0	0	0	0	51	0	0	0	0	0	12
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	unclassified	unclassified	0	30	37	21	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	38	0	0	0	0	12	0	0	14	0	0	0
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Proteocatella	0	43	0	16	0	0	0	0	0	0	0	0
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Anaerotaenia	0	0	0	0	0	38	0	21	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Inhella	14	0	0	0	0	12	12	0	0	0	0	0
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lentilactobacillus	0	0	0	0	33	0	47	0	0	30	0	0
Campilobacterota	Campylobacteria	Campylobacterales	Arcobacteraceae	unclassified	10	44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Cytophagaceae	Flectobacillus	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	54
Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Cytophagaceae	Lacihabitans	28	0	0	0	10	25	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Pectobacteriaceae	unclassified	0	0	0	0	0	88	0	0	0	0	0	0
Actinobacteria	Actinobacteria	Propionibacteriales	Nocardioideae	Aeromicrobium	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Aquabacterium	49	0	0	0	0	0	13	0	0	0	13	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Rhizobacter	68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Pleomorphomonadaceae	Pleomorphomonas	0	0	0	0	0	19	0	17	0	14	0	0
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	unclassified	unclassified	0	29	12	12	0	0	0	0	0	30	0	0
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	unclassified	unclassified	unclassified	0	19	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Cryomorphaeae	unclassified	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	unclassified	0	0	0	0	0	46	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	Rugosibacter	44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Azomonas	0	0	0	0	35	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	Insolitispirillum	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15
Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Cryomorphaeae	Fluviicola	45	0	0	0	11	0	15	0	24	0	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	Pseudaeromonas	0	0	0	0	0	0	0	32	0	0	0	18
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	Trichococcus	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	Aquabacter	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	36	0
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Acetobacterium	0	20	13	16	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Phytobacter	0	0	0	0	0	36	0	0	0	0	0	0

Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Intrasporangiaceae	Ornithinibacter	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Cytophagaceae	Spirosoma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	13
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Azonexaceae	Azonexus	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	19
Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	unclassified	0	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Campilobacterota	Campylobacteria	Campylobacterales	Sulfurospirillaceae	Sulfurospirillum	0	0	0	0	0	10	0	13	0	0	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Chromatiaceae	unclassified	0	0	0	0	0	0	0	0	29	0	0	0
Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	Leucobacter	0	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Methylophilaceae	Methylobacillus	0	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Tissierellaceae	unclassified	0	24	0	27	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Hyphomonadaceae	Asprobacter	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Oligoflexia	Bacteriovorales	Bacteriovoraceae	Bacteriovorax	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Pseudacidovorax	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Thiotrichaceae	Thiothrix	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Actinobacteria	Thermoleophilia	Solirubrobacterales	unclassified	unclassified	0	15	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingopyxis	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfuromonadales	unclassified	unclassified	0	10	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Methylibium	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	unclassified	26	0	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Candidatus Saccharibacteria	unclassified	unclassified	unclassified	Saccharibacteria_genera_incertae_sedis	14	13	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	Elstera	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Intestinibacter	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Alcaligenes	0	38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	unclassified	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Klebsiella	0	0	0	0	0	16	0	0	0	0	0	19
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Rhodanobacteraceae	Dokdonella	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	unclassified	unclassified	14	0	14	19	0	0	0	0	0	0	0	0
Actinobacteria	Actinobacteria	Mycobacteriales	Gordoniaceae	Gordonia	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lacticaseibacillus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	unclassified	unclassified	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Ancalomicrobiaceae	Pinisolibacter	0	0	0	0	0	15	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellvibrionales	Haliaceae	unclassified	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Dysgonomonadaceae	Dysgonomonas	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Dysgonomonadaceae	Fermentimonas	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Brucellaceae	Paenochrobactrum	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Variovorax	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminiclostridium	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	unclassified	0	0	20	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Macromonas	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylocystaceae	unclassified	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Ideonella	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	Roseomonas	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Firmicutes	Bacilli	Bacillales	unclassified	unclassified	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Hyphomicrobium	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	unclassified	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Załącznik 25. Wpływ biopreparatów na pH, barwę i mętność próby

	pH		Barwa [mg/l Pt]		Mętność [NTU]	
	Seria 1	Seria 2	Seria 1	Seria 2	Seria 1	Seria 2
Ścieki oczyszczone	7,85	7,63	45	51	2,75	0,91
Biopreparat EmBio	7,25	7,11	214	242	8,0	7,46
Biopreparat FreeFlow (forma płynna)	-	7,28	-	250	-	20,6
Biopreparat FreeFlow (forma zliofilizowana)	7,88	-	89	-	18,1	-
Biopreparat EmProbiotyk	7,19	6,88	193	169	5,78	1,37
Biopreparat QUANTUM	-	7,39	-	496	-	10,9
Biopreparat EmFarma	7,31	6,97	188	179	5,35	2,86
Biopreparat nr 5	7,66	7,34	350	328	9,80	9,39
Biopreparat A6	7,42	7,17	120	147	4,62	4,07
Biopreparat White Refresh	7,24	7,01	79	70	5,04	2,80
Biopreparat SCD2	7,48	7,14	71	71	3,91	2,99

Załącznik 26. Liczebność bakterii *coli* i *E.coli* w zależności od dawki promieniowania UV

	Próba	<i>E.coli</i>	<i>coli</i>	Bakterie mezofilne	Bakterie psychrofilne	przetrwalniki
		[jtk/100cm ³]				
Seria 1	ścieki oczyszczone	2,3 x 10 ¹	5 x 10 ³	2,3 x 10 ³	5,22 x 10 ²	1 x 10 ²
	UV 100	0	0	9,1 x 10 ²	1 x 10 ¹	0
	UV 80	0	0	6,3 x 10 ²	6	6,1 x 10 ¹
	UV 60	0	0	3,7 x 10 ¹	4	9

	UV 40	0	0	1×10^1	4	0
Seria 2	ścieki oczyszczone	$2,1 \times 10^1$	$1,2 \times 10^2$	$1,16 \times 10^3$	$4,26 \times 10^3$	$1,06 \times 10^2$
	UV 100	0	0	1	4	2×10^1
	UV 80	0	0	1	5	8
	UV 60	0	0	0 0	3 0	2
	UV 40	0	0	5	2	3
Seria 3	ścieki oczyszczone	$1,5 \times 10^1$	$1,5 \times 10^2$	1×10^3	$4,3 \times 10^3$	9×10^1
	UV 100	0	0	0	0	0
	UV 80	0	0	2	2	0
	UV 60	0	0	1	0	1
	UV 40	0	0	5	2	0
Seria 4	ścieki oczyszczone	$2,9 \times 10^1$	$1,2 \times 10^2$			
	UV 100	0	0			
	UV 80	0	0			
	UV 60	0	0			
	UV 40	0	0			
Seria 5	ścieki oczyszczone	7	6×10^1			
	UV 100	0	0			
	UV 80	0	0			
	UV 60	0	0			
	UV 40	0	0			
Seria 6	ścieki oczyszczone	$1,9 \times 10^1$	$2,1 \times 10^3$			
	UV 100	0	0			
	UV 80	0	0			
	UV 60	0	0			
	UV 40	0	0			

Załącznik 27. Zmiany wartości RLU (ATP ogólnego) dla poszczególnych szybkości dezynfekcji UV w kolejnych seriach badań

	Próba	ATP ogólne	ATP zewnątrzkomórkowe
	[RLU/100μl]		
Seria 1	Ścieki oczyszczone	15 853 639	9 521 001
	UV 100	8 027 422	5 904 292
	UV 80	7 743 003	402 481
	UV 60	5 963 759	3 668 540
	UV 40	4 040 224	2 012 223
Seria 2	Ścieki oczyszczone	2 786 039	82 033
	UV 100	1 381 124	217 015
	UV 80	1 393 087	352 968
	UV 60	459 409	320 722
	UV 40	498 675	318 022
Seria 3	Ścieki oczyszczone	967 121	928 270
	UV 100	746 191	482 487
	UV 80	673 996	318 815
	UV 60	581 303	313 054
	UV 40	480 732	460 588
Seria 4	Ścieki oczyszczone	7 575 256	202 972
	UV 100	3 753 834	108 333
	UV 80	3 583 044	288 685
	UV 60	3 200 919	181 363
	UV 40	2 804 808	217 492
Seria 5	Ścieki oczyszczone	2 313 020	19 632
	UV 100	1 206 312	220 919
	UV 80	1 086 913	223 716

	UV 60	1 003 892	76 709
	UV 40	799 923	128 650
Seria 6	Ścieki oczyszczone	3 256 886	40 114
	UV 100	2 780 412	187 202
	UV 80	2 227 713	183 811
	UV 60	1 841 654	471 224
	UV 40	1 690 424	387 439

Załącznik 28. Analiza FCM. Wpływ promieniowania UV na liczbę komórek martwych [LNA] reg.1 i uszkodzonych (reg.2) oraz komórek żywych [HNA] reg.3

Próba	Reg. 1	Reg.2	Reg.3
Ścieki oczyszczone	29 945	349 454	5 279
UV 100	168 548	18 368	3 003
UV 80	225 541	27 184	3 185
UV 60	195 313	24 919	2 244
UV 40	152 489	14 155	1 339

Załącznik 29. Liczebność bakterii w próbce kontrolnej, UV40 i UV100 w kolejnych godzinach doświadczenia

Ścieki oczyszczone	bakterie <i>coli</i>	formy przetrwalnikowe	bakterie mezofilne	bakterie psychrofilne
	[jtk/100cm ³]			
0h	1,74x10 ³	1,06x10 ²	1,16x10 ³	4,26x10 ³
4°C				
24h	4,5x10 ³	1,42x10 ²	8,5 x10 ³	1,8 x10 ³
48h	1,74 x10 ³	1,2 x10 ²	2,5 x10 ³	2,93 x10 ³
72h	9,9 x10 ²	1,05 x10 ²	3,16 x10 ³	4,23 x10 ³
7dni	9,6 x10 ²	6,5x10 ¹	1,76 x10 ³	2,51 x10 ³
20°C				
24h	1,74 x10 ²	2,2 x10 ²	3,34 x10 ²	3,86 x10 ²
48h	3,7 x10 ¹	1,7 x10 ²	2,3 x10 ¹	2,48 x10 ²

72h	$1,1 \times 10^1$	$8,5 \times 10^1$	$2,89 \times 10^2$	$7,4 \times 10^2$
7dni	2×10^1	4×10^1	$1,076 \times 10^3$	$1,05 \times 10^3$
20°C + dodatkowe naświetlanie				
24h	3×10^2	1×10^2	3×10^2	$2,6 \times 10^3$
48h	$1,1 \times 10^2$	$1,26 \times 10^2$	$2,83 \times 10^3$	$3,15 \times 10^3$
72h	$3,5 \times 10^1$	$9,8 \times 10^1$	$2,81 \times 10^3$	$3,12 \times 10^3$
7dni	0	$8,3 \times 10^1$	0	0
UV40				
0h	0	2	5	2
4°C				
24h	0	$6,9 \times 10^1$	1	2
48h	2	$1,8 \times 10^2$	1×10^2	0
72h	1	$3,5 \times 10^1$	0	1×10^1
7 dni	0	0	$3,56 \times 10^2$	$4,23 \times 10^2$
20°C				
24h	0	1×10^1	$7,8 \times 10^1$	$1,7 \times 10^1$
48h	$6,19 \times 10^2$	$2,2 \times 10^1$	$8,34 \times 10^2$	$9,13 \times 10^2$
72h	$5,50 \times 10^2$	$1,1 \times 10^1$	$7,15 \times 10^2$	$9,68 \times 10^2$
7 dni	$4,13 \times 10^2$	2	$1,286 \times 10^3$	$1,234 \times 10^3$
20°C + dodatkowe naświetlanie				
24h	0	1×10^1	0	1
48h	$5,2 \times 10^1$	3	$4,3 \times 10^2$	$1,76 \times 10^3$
72h	$1,57 \times 10^3$	$1,1 \times 10^1$	1×10^3	$8,7 \times 10^2$
7 dni	0	1	5×10^2	5×10^2
UV100				
0h	0	5	$1,9 \times 10^1$	1×10^1
4°C				
24h	0	$4,2 \times 10^1$	1	$2,4 \times 10^1$
48h	6	1×10^1	1×10^2	2×10^2
72h	5	2×10^1	2×10^2	1×10^1

7dni	0	0	0	0
20°C				
24h	0	2,1 x10 ¹	3	2
48h	6,8 x10 ²	1,5 x10 ¹	1,241 x10 ³	8,2 x10 ²
72h	3,64 x10 ²	5	5,7 x10 ²	5,56 x10 ²
7dni	7,1 x10 ¹	0	1,053 x10 ³	6,4 x10 ²
20°C + dodatkowe naświetlanie				
24h	0	1,3 x10 ¹	8	0
48h	3 x10 ²	5	3 x10 ²	1,91 x10 ³
72h	0	9	4,2 x10 ³	9,5 x10 ²
7dni	2,4 x10 ¹	0	5 x10 ²	2,15 x10 ²

Załącznik 30. Wpływ biopreparatów na liczebność bakterii coli w ściekach oczyszczonych i po dezynfekcji promieniami UV po 24h

czas	próba	Temp.	Bakterie coli [jtk/100cm ³]
1 seria			
0h	Ścieki oczyszczone		7,4 x 10 ³
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV		0
24h	Ścieki oczyszczone		1,8 x 10 ²
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV		0
	Ścieki oczyszczone z Biopreparatem A7	20°C	3 x 10 ²
	Ścieki oczyszczone z biopreparatem FreeFlow w formie płynnej	20°C	3 x 10 ²
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z Biopreparatem A7	4°C	5
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z Biopreparatem Free Flow w formie płynnej	4°C	3,2 x 10 ²
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z Biopreparatem A7	20°C	3,4 x 10 ²
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z Biopreparatem Free Flow w formie płynnej	20°C	3,1 x 10 ²
2 seria			
0h	Ścieki oczyszczone		3 x 10 ³
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV		0
24h	Ścieki oczyszczone		4,5 x 10 ²

	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV		0
	Ścieki oczyszczone z biopreparatem FreeFlow w formie zliofilizowanej		$2,9 \times 10^2$
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z Biopreparatem Free Flow w formie zliofilizowanej	20°C z dodatkowym naświetlaniem	3×10^2
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu FreeFlow	4°C bez dostępu światła	$3,3 \times 10^2$
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu FreeFlow	20°C z dodatkowym naświetlaniem	6
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	4°C bez dostępu światła	0
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	20°C z dodatkowym naświetlaniem	0
48h	Ścieki oczyszczone		$5,5 \times 10^1$
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV		8
	Ścieki oczyszczone z biopreparatem FreeFlow w formie zliofilizowanej		$1,3 \times 10^3$
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z Biopreparatem Free Flow w formie zliofilizowanej	20°C z dodatkowym naświetlaniem	$1,1 \times 10^2$
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu FreeFlow	4°C bez dostępu światła	$9,7 \times 10^2$
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu FreeFlow	20°C z dodatkowym naświetlaniem	$4,2 \times 10^1$
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	4°C bez dostępu światła	1×10^1
72h	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	20°C z dodatkowym naświetlaniem	0
	Ścieki oczyszczone		$3,8 \times 10^1$
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	4°C bez dostępu światła	6

	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	20°C z dodatkowym naświetlaniem	3,1 x 10 ¹
3 seria			
0h	Ścieki oczyszczone		1,6 x 10 ³
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV		0
24h	Ścieki oczyszczone		6,9 x 10 ²
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV		0
	Ścieki oczyszczone z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7		7,2 x 10 ²
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	20°C z dodatkowym naświetlaniem	0
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	20°C bez dodatkowego naświetlania	0
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	4°C bez dodatkowego naświetlania	0
48h	Ścieki oczyszczone		1
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV		2
	Ścieki oczyszczone z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7		6,8 x 10 ¹
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	20°C z dodatkowym naświetlaniem	0
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	20°C bez dodatkowego naświetlania	0
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	4°C bez dodatkowego naświetlania	0
72h	Ścieki oczyszczone		3
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV		1 x 10 ¹
	Ścieki oczyszczone z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7		6,3 x 10 ¹
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	20°C z dodatkowym naświetlaniem	3
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	20°C bez dodatkowego naświetlania	1

	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	4°C bez dodatkowego naświetlania	0
7 dni	Ścieki oczyszczone		4
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV		0
	Ścieki oczyszczone z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7		0
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	20°C z dodatkowym naświetlaniem	2
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	20°C bez dodatkowego naświetlania	5
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	4°C bez dodatkowego naświetlania	0

Załącznik 31. Zmiany wartości RLU po 24h w ściekach po dezynfekcji UV i z dodatkiem biopreparatów – inkubowane w temp. 4 i 20°C

data	próba	Temp.	ATP	ATP
			ogólne	zewnątrzkomórkowe
[RLU/100µl]				
Seria 1				
0h	Ścieki oczyszczone		1 520 464	40 154
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV		709 404	96 236
24h	Ścieki oczyszczone		1 220 532	44 303
	Ścieki oczyszczone z Biopreparatem A7	20°C	16 641 292	42 805
	Ścieki oczyszczone z biopreparatem FreeFlow w formie płynnej	20°C	86 099 648	119 173
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z Biopreparatem A7	4°C	1 380 740	430 531
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z Biopreparatem Free Flow w formie płynnej	4°C	12 712 877	753 785
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z Biopreparatem A7	20°C	2 848 767	69 695
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z Biopreparatem Free Flow w formie płynnej	20°C	67 186 784	206 384
	Seria 2			
0h	Ścieki oczyszczone		11 503 658	39 349
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV		5 149 428	99 663

24h	Ścieki oczyszczone		10 924 312	72 119
	Ścieki oczyszczone z biopreparatem FreeFlow w formie zliofilizowanej		39 166 720	107 111
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z Biopreparatem Free Flow w formie zliofilizowanej	20°C z dodatkowym naświetlaniem	13 254 358	91 319
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu FreeFlow	4°C bez dostępu światła	6 032 540	37 865
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu FreeFlow	20°C z dodatkowym naświetlaniem	12 760 206	59 061
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	4°C bez dostępu światła	4 117 675	34 055
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	20°C z dodatkowym naświetlaniem	3 415 565	57 738
48h	Ścieki oczyszczone		9 527 637	415 569
	Ścieki oczyszczone z biopreparatem FreeFlow w formie zliofilizowanej		75 678 912	541 736
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z Biopreparatem Free Flow w formie zliofilizowanej	20°C z dodatkowym naświetlaniem	65 215 396	101 593
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu FreeFlow	4°C bez dostępu światła	12 063 352	66 483
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu FreeFlow	20°C z dodatkowym naświetlaniem	4 048 730	164 606
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	4°C bez dostępu światła	2 431 587	52 773
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	20°C z dodatkowym naświetlaniem	10 271 291	163 589
72h	Ścieki oczyszczone		8 639 550	208 365
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	4°C bez dostępu światła	6 574 653	24 988

	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	20°C z dodatkowym naświetlaniem	57 03 544	20 455
Seria 3				
0h	Ścieki oczyszczone		11 730 017	29 525
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV		6 308 345	90 179
	Ścieki oczyszczone z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7		16 915 094	58 641
24h	Ścieki oczyszczone		13 062 212	100 843
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV		12 424 455	62 143
	Ścieki oczyszczone z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7		2 469 394	64 872
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	20°C z dodatkowym naświetlaniem	5 472 842	46 410
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	20°C bez dodatkowego naświetlania	5 667 626	41 855
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	4°C bez dodatkowego naświetlania	7 585 209	41 075
	Ścieki oczyszczone z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7			
48h	Ścieki oczyszczone		12 513 152	
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV		5 673 189	
	Ścieki oczyszczone z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7		7 518 584	
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	20°C z dodatkowym naświetlaniem	13 159 055	
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	20°C bez dodatkowego naświetlania	7 989 792	
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	4°C bez dodatkowego naświetlania	13 223 649	
72h	Ścieki oczyszczone		16 639 749	

	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV		1 944 661	
	Ścieki oczyszczone z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7		2 019 354	
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	20°C z dodatkowym naświetlaniem	3 481 558	
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	20°C bez dodatkowego naświetlania	4093229	
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	4°C bez dodatkowego naświetlania	7 273 338	
7 dni	Ścieki oczyszczone		2 492 398	
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV		2 027 829	
	Ścieki oczyszczone z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7		2 250 709	
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	20°C z dodatkowym naświetlaniem	3 064 395	
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	20°C bez dodatkowego naświetlania	3 221 503	
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji UV z mikroorganizmami wyizolowanymi z biopreparatu A7	4°C bez dodatkowego naświetlania	5 621 272	

Załącznik 32. Analiza FCM po 24h w ściekach po dezynfekcji UV i z dodatkiem biopreparatów – inkubowane w temp. 4°C, 20°C z dodatkowym naświetlaniem oraz 20°C z ograniczonym dostępem światła

czas	próba	temperatura	seria	Reg.1.	Reg.1. [%]	Reg.2	Reg.2. [%]	Reg.3	Reg.3[%]
0h	Ścieki oczyszczone		1	14 583	18	43 998	54	19 546	24
			2	12 877	15	40 335	50	12 138	15
	Ścieki po dezynfekcji		1	14 932	16	48 219	54	22 994	25
			2	12 743	14	43 178	48	16 258	18
24h	Ścieki oczyszczone		1	8 855	18	24 240	49	14 952	30

		20°C z ograniczonym dostępem światła	2	5 746	11	17 378	35	5 128	10
	Ścieki po dezynfekcji		1	10 379	24	21 908	51	9 423	22
			2	6 885	16	12 485	29	3 945	9
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem EmBio z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami		1	15 719	23	34 410	50	16 370	24
			2	13 879	20	26 000	38	6 658	9
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem EmBio w formie płynnej		1	51 082	49	27 361	26	22 016	21
			2	50 093	48	20 316	19	14 211	13
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem FreeFlow z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami		1	102 479	35	78 101	27	101 536	35
			2	108 314	37	78 073	27	74 080	25
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem FreeFlow w formie płynnej		1	118 824	24	63 505	12	301 329	61
			2	128 813	26	98 240	19	236 054	47
	Ścieki oczyszczone wzbogacone Biopreparatem EmBio w formie płynnej		1	14 249	8	45 515	25	112 771	63
			2	11 483	6	84 411	47	44 218	24
48h	Ścieki oczyszczone		1	19 882	34	23 016	39	13 817	23
		2	18 727	32	23 328	40	4 500	7	
	Ścieki po dezynfekcji	1	29 013	34	33 592	39	19 422	23	
		2	27 741	32	30 768	36	8 367	9	
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem EmBio z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami	1	18 480	31	26 009	44	12 186	20	
		2	17 031	29	26 663	45	2 594	4	
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem EmBio w formie płynnej	1	94 663	15	379 166	63	85 397	14	
		2	155 126	25	280 083	46	19 520	3	
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem FreeFlow z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami	1	82 722	25	75 132	22	166 978	50	
		2	61 288	18	66 711	20	145 025	43	
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem FreeFlow w formie płynnej	1	92 873	14	65 386	9	453 921	68	
		2	101 702	15	70 855	10	400 465	60	

	Ścieki oczyszczone wzbogacone Biopreparatem EmBio z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami	1	551 326	79	70 928	10	54 208	7
		2	347 852	50	69 809	10	24 888	3
72h	Ścieki oczyszczone	1	23 461	33	36 822	51	8 479	11
		2	26 171	36	35 594	50	2 601	3
	Ścieki po dezynfekcji	1	36 901	31	42 392	36	34 125	29
		2	37 191	32	58 173	50	6 597	5
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem EmBio z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami	1	26 683	26	36 299	36	32 156	32
		2	25 837	25	49 581	49	7 523	7
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem EmBio w formie płynnej	1	128 357	46	96 420	35	30 204	10
		2	110 237	40	64 624	23	11 549	4
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem FreeFlow z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami	1	59 756	19	134 850	44	102 654	33
		2	61 521	20	147 230	48	46 677	15
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem FreeFlow w formie płynnej	1	18 199	3	30 360	6	443 783	88
		2	17 557	3	169 242	33	208 948	41
	Ścieki oczyszczone wzbogacone Biopreparatem EmBio z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami	1	24 497	24	44 224	44	27 458	27
		2	22 513	22	46 539	47	13 736	13
7 dni	Ścieki oczyszczone	1	18 912	28	22 603	33	22 590	33
		2	18 692	27	25 902	38	11 131	16
	Ścieki po dezynfekcji	1	32 264	53	15 743	26	6 695	11
		2	29 581	49	13 343	22	1 877	3
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem EmBio z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami	1	31 491	21	40 580	27	68 621	47
		2	30 904	21	73 321	50	19 456	13
			1	160 434	45	152 057	43	25 010

	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem EmBio w formie płynnej		2	194 423	55	105 692	30	10 768	3
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem FreeFlow z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami		1	42 717	11	200 568	53	122 848	32
			2	45 709	12	215 832	57	665 10	17
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem FreeFlow w formie płynnej		1	54 908	9	127 839	22	358 852	63
			2	71 997	12	359 001	63	94 937	16
	Ścieki oczyszczone wzbogacone Biopreparatem EmBio z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami		1	22 436	20	39 455	35	44 244	40
2		22 161	20	57 157	51	12 709	11		
24h	Ścieki oczyszczone	20°C z dodatkowym naświetlaniem	1	6 931	20	15 588	46	10 666	31
			2	4 668	13	11 173	33	3 763	11
	Ścieki po dezynfekcji		1	12 953	25	25 034	50	11 396	22
			2	9 121	18	15 232	30	4 615	9
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem EmBio z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami		1	99 661	61	50 557	31	11 689	7
			2	102 951	63	32 907	20	6 494	3
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem EmBio w formie płynnej		1	48081	49	25073	25	20 805	21
			2	46 727	48	18 053	18	13 638	14
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem FreeFlow z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami		1	135 471	38	115 176	33	95 602	27
			2	147 320	42	108 578	31	64 045	18
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem FreeFlow w formie płynnej		1	129 028	23	64 436	11	352 527	63
			2	140 407	25	111 166	20	270 819	49
	Ścieki oczyszczone wzbogacone Biopreparatem EmBio z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami		1	17 903	10	60 293	34	93 017	52
			2	15 235	8	91 326	52	31 469	17
48h	Ścieki oczyszczone	1	461 442	81	40 427	7	27 003	4	
		2	288 612	50	38 234	6	13 980	2	
	Ścieki po dezynfekcji	1	507 812	80	61 204	9	35 625	5	
		2	423 297	67	53 009	8	15 570	2	

	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem EmBio z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami	1	457 157	78	46 910	8	36 263	6	
		2	384 290	66	38 869	6	14 689	2	
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem EmBio w formie płynnej	1	403 219	57	219 020	31	52 637	7	
		2	328316	46	186471	26	14 001	1	
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem FreeFlow z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami	1	227307	38	127870	21	192 718	32	
		2	200 936	34	172 423	29	111 356	18	
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem FreeFlow w formie płynnej	1	127 674	20	48 231	7	409 990	63	
		2	127 873	20	56 053	9	357 033	57	
	Ścieki oczyszczone wzbogacone wyizolowanymi bakteriami z Biopreparatu EmBio	1	459 251	78	39 497	6	46 414	7	
		2	330 395	56	46 244	7	22 764	3	
	72h	Ścieki oczyszczone	1	23 707	31	40 179	52	10 893	14
			2	22 624	29	36 965	48	4 492	5
Ścieki po dezynfekcji		1	32 239	28	57 060	50	21 716	19	
		2	30 776	27	62 568	55	4 176	3	
Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem EmBio z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami		1	23 829	27	40 740	47	18 434	21	
		2	22 708	26	45 030	52	4 851	5	
Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem EmBio w formie płynnej		1	163 924	43	101 951	26	104 080	27	
		2	139 258	36	110 270	29	37 487	9	
Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem FreeFlow z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami		1	40 773	22	47 752	26	89 863	49	
		2	39 172	21	86 753	47	22 736	12	
Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem FreeFlow w formie płynnej		1	7 854	1	29 819	6	452 851	91	
		2	8 117	1	218 120	44	200 792	40	
Ścieki oczyszczone wzbogacone wyizolowanymi bakteriami z Biopreparatu EmBio	1	21 952	25	48 117	55	15 186	17		
	2	21 497	24	46 834	54	5 290	6		
7 dni	Ścieki oczyszczone	1	16 427	28	16 353	28	23 322	40	
		2	12 941	22	19 182	33	11 976	20	
	Ścieki po dezynfekcji	1	14 920	54	6 687	24	4 923	17	

			2	9 976	36	7 069	25	1 558	5
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem EmBio z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami		1	21 393	47	11 186	24	9 939	22
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem EmBio w formie płynnej		2	13 406	29	12 057	26	4 029	8
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem FreeFlow z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami		1	180 797	41	237 888	54	12 602	2
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem FreeFlow w formie płynnej		2	212 342	48	178 538	41	3 085	0
	Ścieki oczyszczone wzbogacone Biopreparatem EmBio z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami		1	25 949	22	47 542	41	34 220	29
			2	21 563	18	54 269	47	14 865	12
			1	16 937	3	184 474	41	224 791	50
			2	20 331	4	354 163	80	38 838	8
			1	11 509	19	18 684	31	28 147	47
			2	10 650	17	32 099	53	6 716	11
24h	Ścieki oczyszczone	4°C	1	13 378	25	25 073	46	14 116	26
			2	8 008	14	15 407	28	6 102	11
	Ścieki po dezynfekcji		1	13 182	24	28 073	51	12 566	23
			2	8 172	15	14 644	26	5 435	9
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem EmBio z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami		1	15 707	29	24 199	45	13 036	24
			2	11 881	22	14 115	26	6 613	12
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem EmBio w formie płynnej		1	55 341	53	23 144	22	21 832	21
			2	51 809	50	19 276	18	13 236	12
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem FreeFlow z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami		1	12 655	14	27 568	32	43 509	51
			2	10 192	11	30 399	35	25 407	29
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem FreeFlow w formie płynnej		1	48 696	14	120 475	36	159 888	47
			2	50 613	15	179 327	53	74 513	22
	Ścieki oczyszczone wzbogacone Biopreparatem EmBio z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami		1	17 791	28	25 043	40	17 304	28
			2	11 140	18	16 617	27	8 513	13
48h	Ścieki oczyszczone		1	29 719	31	46 419	49	16 130	17

		2	27 487	29	42 565	44	6 571	6
	Ścieki po dezynfekcji	1	12 658		26 752		10 328	
		2	10 122					
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem EmBio z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami	1	35 159	38	36 375	39	16 777	18
		2	34 594	37	33 558	36	6 189	6
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem EmBio w formie płynnej	1	65 398	36	85 499	47	2 2582	12
		2	67 833	37	74 984	41	5 292	2
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem FreeFlow z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami	1	56 189	34	50 887	31	4 4788	27
		2	51 061	31	47 972	29	34 049	20
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem FreeFlow w formie płynnej	1	62 647	20	46 111	15	179 924	59
		2	65 428	21	67 744	22	144219	47
	Ścieki oczyszczone wzbogacone wyizolowanymi z Biopreparatu EmBio mikroorganizmami	1	29 736	32	39 901	43	18 758	20
		2	20 628	22	37 214	40	9 967	10
72h	Ścieki oczyszczone	1	25 555	32	32 075	41	17 568	22
		2	20 956	26	31 765	40	9 318	11
	Ścieki po dezynfekcji	1	42 346	43	36 533	37	14 510	14
		2	35 321	36	33 211	33	7 178	7
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem EmBio z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami	1	31 483	39	31 214	39	13 378	16
		2	26 200	33	28 197	35	5 631	7
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem EmBio w formie płynnej	1	72 037	39	82 520	45	18 422	10
		2	71 358	39	48 451	26	2 924	1
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem FreeFlow z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami	1	68 501	39	51 358	29	39 572	23
		2	61 908	36	46 060	26	28 306	16
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem FreeFlow w formie płynnej	1	83 174	23	52 468	14	203 241	56
		2	72 552	20	63 829	17	128 893	35
	Ścieki oczyszczone wzbogacone wyizolowanymi bakteriami z Biopreparatu EmBio	1	30 559	29	51 757	50	17 822	17
		2	30 978	29	47 734	46	8 167	7

7 dni	Ścieki oczyszczone	1	3 887	45	3 515	41	670	7
		2	1 170	13	701	8	41	0
	Ścieki po dezynfekcji	1	34 898	39	34 772	39	14 937	17
		2	29 688	33	33 165	37	5 908	6
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem EmBio z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami	1	34 150	39	35 055	40	14 080	16
		2	26 008	30	32 267	37	6 398	7
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem EmBio w formie płynnej	1	107 821	41	108 792	4	34 683	13
		2	115 716	44	90 726	34	10 935	4
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem FreeFlow z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami	1	55 301	29	65 950	34	56 231	29
		2	50 046	26	65 961	34	41 467	21
	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji wzbogacone Biopreparatem FreeFlow w formie płynnej	1	83 660	21	83 550	21	208 462	53
		2	92 178	23	112 010	28	156 180	40
	Ścieki oczyszczone wzbogacone Biopreparatem EmBio z wyizolowanymi od podłoża mikroorganizmami	1	50 962	24	102 466	48	52 228	24
		2	51 236	24	110 345	52	23 661	11

Załącznik 33. Wpływ czasu ozonowania na efekt dezynfekcji

wersja 1	Ścieki oczyszczone	Ścieki oczyszczone*	1min./dm ³	1min./dm ³ *	3min./dm ³	3min./dm ³ *	5min./dm ³	5min./dm ³ *	7min./dm ³	7min./dm ³ *	9min./dm ³	9min./dm ³ *
<i>E.coli</i> [jtk/100cm ³]	6,5 x 10 ³	5,9 x 10 ³	1,3 x 10 ³	9 x 10 ² j	3,9 x 10 ²	3,6 x 10 ²	2,41 x 10 ²	2,52x10 ²	119 x 10 ¹	1,5 x 10 ¹	1	0
<i>coli</i> [jtk/100cm ³]	3,5 x 10 ⁴	4,1 x 10 ⁴	8 x 10 ³	1 x 10 ⁴	1,9 x 10 ³	2,1 x 10 ³	1,3 x 10 ³	1,45x10 ³	1,8 x 10 ²	1,1 x 10 ²	9	0
mezofile [jtk/1cm ³] (agar A)	3,745 x 10 ⁴	3,15 x 10 ⁴	9,329 x10 ³	9,52 x 10 ³	1,233x10 ³	1,5 x 10 ³	7,93 x10 ²	7,62x10 ²	2,3 x 10 ¹	1,8 x 10 ¹	1,3x10 ¹	5
mezofile [jtk/1cm ³] (agar R)	3,855 x 10 ⁴	4 x 10 ⁴	8,905 x10 ³	1,125 x10 ⁴	3,195x10 ³	3,32 x 10 ³	1,16 x10 ³	9,9 x 10 ²	7,2 x 10 ¹	6,5 x 10 ¹	2,3x10 ¹	1,7 x 10 ¹

psychrofile [jtk/1cm ³] (agar A)	1,535 x 10 ⁴	1,398 x 10 ⁴	1,45 x 10 ³	9,9 x 10 ²	2,54 x 10 ²	3,5x10 ²	1,56x10 ²	1,13x10 ²	1,2 x 10 ²	9,8 x 10 ¹	6	0
psychrofile [jtk/1cm ³] (agar R)	1,8 x 10 ⁴	1,625 x 10 ⁴	3 x 10 ³	3,85 x 10 ³	1 x 10 ³	1,32 x 10 ³	1,8 x 10 ²	2,5 x 10 ²	6,3 x 10 ¹	5,9 x 10 ¹	8	2
wersja 2	Ścieki oczyszczone	Ścieki oczyszczone*	1min./dm ³	1min./ dm ³ *	3min./ dm ³	3min./ dm ³ *	5min./ dm ³	5min./ dm ³ *	7min./ dm ³	7min./ dm ³ *	9min./ dm ³	9min./ dm ³ *
<i>E.coli</i> [jtk/100cm ³]	5,1 x 10 ³	4,5 x 10 ³	1,25 x 10 ³	1,3 x 10 ³	1 x 10 ³	1,1 x 10 ³	9,8 x 10 ¹	1 x 10 ²	2,3 x 10 ¹	1,8 x 10 ¹	0	0
<i>coli</i> [jtk/100cm ³]	1,2 x 10 ⁴	1,25 x 10 ⁴	4,3 x 10 ³	3,9 x 10 ³	3 x 10 ³	2,85 x 10 ³	9,5 x 10 ²	5,5 x 10 ²	9,5 x 10 ¹	8 x 10 ¹ j	0	2
mezofile [jtk/1cm ³] (agar A)	1,325 x 10 ⁴	1,495 x 10 ⁴	6,1 x 10 ³	5,9 x 10 ³	3,77x10 ³	3,55 x 10 ³	5,95x10 ²	3,25x10 ²	8,2 x 10 ¹	7,5 x 10 ¹	9	1
mezofile [jtk/1cm ³] (agar R)	1,64 x 10 ⁴	1,895 x 10 ⁴	6,8 x 10 ³	6,5 x 10 ³	3,34 x 10 ³	3,625 x 10 ³	3,8 x 10 ²	3,35x10 ²	1,9 x 10 ¹	2,5 x 10 ¹	1,2x10 ¹	3
psychrofile [jtk/1cm ³] (agar A)	1,59 x 10 ⁴	1,71 x 10 ⁴	3,1 x 10 ³	3 x 10 ³	4,4 x 10 ²	3,2 x 10 ²	5,9 x 10 ¹	6,2 x 10 ¹	3,1 x 10 ¹	2 x 10 ¹	3	0
psychrofile [jtk/1cm ³] (agar R)	1,275 x 10 ⁴	1,77 x 10 ⁴	3,52 x 10 ³	3,3 x 10 ³	6,1 x 10 ²	4,25 x 10 ²	6,6 x 10 ¹	4,4 x 10 ¹	3,7 x 10 ¹	3,2 x 10 ¹	2 x 10 ¹	1

*powtórzenie

Załącznik 34. Skuteczność działania ozonu w eliminacji bakterii

próba	Bakterie mezofilne [jtk/1cm ³]	Bakterie psychrofilne [jtk/1cm ³]	Bakterie <i>coli</i> [jtk/100cm ³]	Bakterie <i>E.coli</i> [jtk/100cm ³]
Ścieki oczyszczone	1,2 x 10 ⁴	2,8 x 10 ⁴	1,4 x 10 ³	2,5 x 10 ²
1 min./dm ³	4,3 x 10 ²	8,2 x 10 ²	7 x 10 ²	5 x 10 ¹
3 min./dm ³	1,8 x 10 ²	7,4 x 10 ²	3,6 x 10 ²	2,2 x 10 ¹
5 min./dm ³	1,05 x 10 ²	1,35 x 10 ²	3 x 10 ¹	71

7 min./dm ³	2 x 10 ¹	8,5 x 10 ¹	7	1
9 min./dm ³	3	7	1	0
11 min./dm ³	0	0	0	0
13 min./dm ³	0	0	0	0
15 min./dm ³	0	0	0	0

Załącznik 35. Zmiany wartości RLU dla różnych czasów dezynfekcji ozonem w serii 1

ATP		
Seria 1	ATP ogólne	ATP zewnątrzkomórkowe
Ścieki oczyszczone	3 753 935	106 409
1 min./dm ³	2 581 969	187 374
3min./ dm ³	2 222 102	583 962
5min./ dm ³	1 416 770	1 071 313
7min./ dm ³	1 262 681	2 243 320
9min./ dm ³	638 101	858 725
Seria 2	ATP ogólne	ATP zewnątrzkomórkowe
Ścieki oczyszczone	3 857 982	1 39 467
3 min./dm ³	1 884 085	1 253 077
5 min./ dm ³	1 574 538	1 260 738
7 min./ dm ³	1 308 803	1 033 349
9 min./ dm ³	638 101	858 725

Załącznik 36. Zmiany wartości RLU dla różnych czasów dezynfekcji ozonem w serii 2

Próba	ATP ogólne	ATP zewnątrzkomórkowe
Ścieki oczyszczone	1 129 109	43 786
1 min./dm ³	767 904	335 206
3min./ dm ³	1 427 547	922 235
5min./ dm ³	1 489 198	1 035 365
7min./ dm ³	1 027 895	1 075 797
9min./ dm ³	1 249 084	862 475

11 min./ dm3	833 750	891 061
13 min./ dm3	832 097	625 647
15 min./ dm3	819 452	656 840

Załącznik 37. Analiza FCM. Wpływ na liczbę komórek martwych [LNA] i komórek żywych [HNA] podczas dezynfekcji ozonem

Seria 1	HNA	HNA*	HNA%	LNA	LNA*	LNA%
Ścieki oczyszczone	598 340	613 117	80%	86 988	81 624	10%
1 min./dm3	579 386	602 287	78%	107 770	10 3711	15%
3min./ dm3	288 489	154 593	40%	287 020	339 900	45%
5min./ dm3	286 279	336 893	36%	329 221	338 315	42%
7min./ dm3	528 181	637 724	85%	94 435	98 190	15%
Seria 2	HNA	HNA*	HNA%	LNA	LNA*	LNA%
Ścieki oczyszczone	556 467	620 339	80%	59 471	56 644	10%
3min./ dm3	495 918	555 809	70%	151 996	151 802	20%
5min./ dm3	533 181	565 053	70%	161 722	154 539	20%
7min./ dm3	437 831	529 960	80%	18 571	16 469	20%
9min./ dm3	324 052	381 444	77%	5 831	5 439	10%

Załącznik 38. Analiza FCM. Wpływ czasu ozonowania na liczbę komórek martwych [LNA] i komórek żywych [HNA]

	HNA	HNA%	LNA	LNA%
Ścieki oczyszczone	1 687 93	31%	219 823	40%
1 min./dm3	16 832	8%	108 197	57%
3min./ dm3	8 471	3%	140 898	62%
5min./ dm3	5 499	5%	67 785	62%
7min./ dm3	4 957	5%	63 960	64%
9min./ dm3	1 110	2%	23 594	62%
11 min./ dm3	1 521	3%	30 149	61%
13 min./ dm3	1 588	2%	42 956	71%
15 min./ dm3	1 372	2%	28 827	61%

Załącznik 39. Zmiany liczebności bakterii psychrofilnych, mezofilnych, bakterii z grupy coli i E. coli oraz form przetrwalnikowych podczas badania stabilności dla 9 minut ozonowania

		4°C	
		Ścieki oczyszczone	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji
0h	Bakterie mezofilne [jtk/1cm ³]	4,485 x 10 ³	0
24h		4 x 10 ³	3,1 x 10 ¹
48h		3 x 10 ³	5
72h		1,85 x 10 ³	1,82 x 10 ²
7dni		1,2 x 10 ²	5
			Ścieki oczyszczone
0h	Bakterie psychrofilne [jtk/1cm ³]	8,63 x	0
24h		5,33 x 10 ³	8
48h		3,5 x 10 ³	1 x 10 ¹
72h		1,45 x 10 ³	1,1 x 10 ¹
7dni		1,78 x 10 ³	6
			Ścieki oczyszczone
0h	Bakterie <i>E.coli</i> [jtk/100cm ³]	1,59 x 10 ³	0
24h		2,53 x 10 ³	0
48h		8 x 10 ²	0
72h		1,05 x 10 ³	0
7dni		1,5 x 10 ²	5
			Ścieki oczyszczone
0h	Bakterie <i>coli</i> [jtk/100cm ³]	3,71 x 10 ³	0
24h		2,53 x 10 ³	1
48h		1,6 x 10 ³	0
72h		2,45 x 10 ³	0
7dni		3 x 10 ²	0
			Ścieki oczyszczone
0h	Formy przetrwalnikujące bakterii [jtk/1cm ³]	1,07 x 10 ³	0
24h		4,7 x 10 ²	1
48h		4 x 10 ²	5
72h		2,4 x 10 ²	3
7dni		1,5 x 10 ²	1

15°C			
		Ścieki oczyszczone	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji
0h	Bakterie mezofilne [jtk/1cm ³]	4,4850 x 10 ⁴	0
24h		3,9 x 10 ³	3,9 x 10 ¹
48h		3 x 10 ²	1,8 x 10 ²
72h		3,4 x 10 ²	1,75 x 10 ² jt
7dni		7 x 10 ¹	5
		Ścieki oczyszczone	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji
0h	Bakterie psychrofilne [jtk/1cm ³]	8,63 x 10 ³	0
24h		8,6 x 10 ³	2,07 x 10 ²
48h		1,6 x 10 ³	3,12 x 10 ²
72h		3,6 x 10 ²	2,33 x 10 ²
7dni		1 x 10 ²	3 x 10 ²
		Ścieki oczyszczone	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji
0h	Bakterie <i>E.coli</i> [jtk/100cm ³]	1,59 x 10 ³	0
24h		1,11 x 10 ³	0
48h		1 x 10 ²	2 x 10 ¹
72h		3,4 x 10 ²	2,69 x 10 ²
7dni		9 x 10 ¹	1
		Ścieki oczyszczone	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji
0h	Bakterie <i>coli</i> [jtk/100cm ³]	3,71 x 10 ³	0
24h		2,59 x 10 ³	9
48h		1 x 10 ²	4,8 x 10 ¹
72h		4 x 10 ²	1 x 10 ³
7dni		1 x 10 ¹	1,3 x 10 ²
		Ścieki oczyszczone	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji
0h	Formy przetrwalnikujące bakterii [jtk/1cm ³]	1,07 x 10 ³	0
24h		3,3 x 10 ²	9
48h		3 x 10 ²	5
72h		9 x 10 ¹	8
7dni		1,2 x 10 ²	5
28°C			
		Ścieki oczyszczone	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji

0h	Bakterie mezofilne [jtk/1cm ³]	4,485 x 10 ³	0
24h		1,53 x 10 ³	2,87 x 10 ²
48h		8 x 10 ²	5,3 x 10 ²
72h		2 x 10 ²	9 x 10 ¹
7dni		2 x 10 ¹	1 x 10 ¹
		Ścieki oczyszczone	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji
0h	Bakterie psychrofilne [jtk/1cm ³]	8,63 x 10 ²	0
24h		2,46 x 10 ²	9,38 x 10 ²
48h		3 x 10 ¹	3,5 x 10 ²
72h		4,41 x 10 ²	3,62 x 10 ²
7dni		3 x 10 ¹	5 x 10 ²
		Ścieki oczyszczone	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji
0h	Bakterie <i>E.coli</i> [jtk/100cm ³]	1,59 x 10 ³	0
24h		8 x 10 ²	1,6 x 10 ¹
48h		1 x 10 ²	1 x 10 ¹
72h		2 x 10 ¹	5
7dni		9 x 10 ¹	3
		Ścieki oczyszczone	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji
0h	Bakterie <i>coli</i> [jtk/100cm ³]	3,71 x 10 ³	0
24h		4 x 10 ³	3,88 x 10 ²
48h		8,5 x 10 ²	2 x 10 ¹
72h		7 x 10 ²	3 x 10 ²
7dni		3,5 x 10 ²	4 x 10 ¹
		Ścieki oczyszczone	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji
0h	Formy przetrwalnikujące bakterii [jtk/1cm ³]	1,07 x 10 ²	0
24h		4,7 x 10 ¹	8
48h		0	4
72h		9	2
7dni		1,3 x 10 ¹	2

Załącznik 40. Zmiany liczebności bakterii *coli*, *E. coli*, mezofilnych i psychrofilnych podczas badania stabilności 11 min

Ścieki oczyszczone po dezynfekcji		4°C	15°C	28°C
0h	Bakterie mezofilne [jtk/1cm ³]	0	0	0

24h		2×10^2	1×10^2	1×10^3
48h		3	$3,22 \times 10^2$	$7,94 \times 10^4$
72h		4	1×10^3	$9,3 \times 10^4$
7dni		3	$3,15 \times 10^3$	$1,5 \times 10^5$
0h	Bakterie psychrofilne [jtk/1cm ³]	0	0	0
24h		4×10^1	$3,6 \times 10^1$	$4,76 \times 10^2$
48h		6	$7,27 \times 10^2$	$5,78 \times 10^2$
72h		2×10^1	$1,5 \times 10^3$	2×10^3
7dni		$2,3 \times 10^2$	$2,5 \times 10^3$	$6,7 \times 10^3$
0h	Bakterie <i>E.coli</i> [jtk/100cm ³]	0	0	0
24h		0	0	2
48h		0	0	$1,1 \times 10^1$
72h		0	8	$3,5 \times 10^1$
7dni		1	$1,3 \times 10^1$	9
0h	Bakterie <i>coli</i> [jtk/100cm ³]	0	0	0
24h		0	0	2×10^2
48h		0	0	6×10^3
72h		4	$4,7 \times 10^1$	$1,66 \times 10^2$
7dni		7	$9,6 \times 10^1$	$3,9 \times 10^1$

Załącznik 41. Zmiany wartości RLU ścieków po ozonowaniu; wariant 1; badanie w temperaturach 4, 15 i 28°C

	Ścieki oczyszczone		Ścieki oczyszczone po dezynfekcji ozonem przez 9 minut	
	ATP ogólne	ATP zewnątrzkomórkowe	ATP ogólne	ATP zewnątrzkomórkowe
4°C				
0h	4 844 923	5 4328	699 413	679 062
24h	5 540 214	55 486	1 365 041	1 289 265
48h	1 789 565	38 199	1 357 098	1 185 492
72h	1 042 616	119 912	999 533	1 026 587
7dni	1 213 739	67 186	167 342	38 518
15°C				
0h	4 844 923	54328	699 413	679 062
24h	4 011 923	31 683	904 863	984 689
48h	2 589 462	165 801	550 509	19 031

72h	3 699 290	129 109	1 059 611	26 707
7dni	370 951	16 677	1 720 821	89 725
28°C				
0h	4 844 923	54 328	699 413	679 062
24h	3 226 552	147 190	2 712 333	37 263
48h	468 596	118 950	1 291 307	31 144
72h	528 086	21 686	1 751 849	99 740
7dni	1 718 772	19 246	481 570	14 344

Załącznik 42. Zmiany wartości RLU ścieków po ozonowaniu; wariant 2; badanie w temperaturach 4, 15 i 28°C

Ścieki oczyszczone po dezynfekcji ozonem przez 11 minut	ATP ogólne	ATP zewnątrzkomórkowe
4°C		
0h	871362	637804
24h	1238446	1222817
48h	1293705	1181383
72h	1208355	1201585
7dni	730517	776763
15°C		
0h	871362	637804
24h	963604	1016303
48h	801724	705447
72h	1387238	241247
7dni	3170366	61566
28°C		
0h	871362	637804
24h	438561	27668
48h	1203223	27236
72h	910905	33363
7dni	1001102	30644

Załącznik 43. Analiza FCM w stabilności mikrobiologicznej ścieków dezynfekowanych ozonem

czas	LNA	LNA%	HNA	HNA%	III reg.	III reg. %
4°C						
0h	35 128	94	2 100	6		
24h	4 847	66	405	5		
48h	8 170	69	6 280	5		
72h	12 968	48	5 909	21		
7dni	5 769	80	1 062	14	309	4
15°C						
0h	35 128	94	2 100	6		
24h	5 963	61	501	5		
48h	6 529	53	1 737	14	526	4
72h	4 276	2	10 593	6	99 034	56
7dni	11 185	6	118 534	6	59 720	3
28°C						
0h	35 128	94	2 100	6		
24h	7 238	65	590	5		
48h	16 183	24	14 230	22	29 199	45
72h	15 984	27	12 274	21	20 130	35
7dni	4 915	29	5 280	3	6 765	4

Załącznik 44. Liczba bakterii coli w próbie kontrolnej (ściekach oczyszczonych) i po ozonowaniu oraz z dodatkiem biopreparatu w skali logarymicznej

Coli [jtk/100c m ³]	Próba kontrolna		Próba kontrolna z Biopreparatem z wyizolowanymi mikroorganizmami		Próba kontrolna z Biopreparatem w formie płynnej	Próba po ozonowaniu		Próba po ozonowaniu z Biopreparatem z wyizolowanymi mikroorganizmami		Próba po ozonowaniu z Biopreparatem w formie płynnej
	Seria 1	Seria 2	Seria 1	Seria 2		Seria 1	Seria 2	Seria 1	Seria 2	
4°C										
0h	5,6 x 10 ¹	1,4 x 10 ³	5,6 x 10 ¹	1,4 x 10 ³	1,4 x 10 ³	0	0	0	0	0
24h	1 x	4 x 10 ¹	1,1 x 10 ²	0	4x10 ²	0	0	0	0	0
48h	4 x 10 ¹	5,5 x 10 ¹	6 x 10 ¹	1 x 10 ²	4,5x10 ¹	2	0	0	1,1 x 10 ²	9x10 ¹
72h	1,6 x 10 ¹	4,5 x 10 ¹	7	4,5 x 10 ¹	1,81x10 ²	2	3	1	0	1x10 ²
7dni	7	0	2	2 x 10 ²	4,6x10 ⁴	1	0	0	0	1,3x10 ²
15°C										
0h	5,6 x 10 ¹	1,4 x 10 ³	5,6 x 10 ¹	1,4 x 10 ³	1,4 x 10 ³	0	0	0	0	0
24h	4 x 10 ¹	0	7 x 10 ¹	2 x 10 ²	3,4x10 ³	1	0	2	1 x 10 ²	7x10 ²
48h	3 x 10 ¹	2,6 x 10 ¹	3,8 x 10 ²	1 x 10 ³	6x10 ⁴	1	0	1,9 x 10 ¹	3,2 x 10 ²	3x10 ³
72h	4,1 x 10 ¹	4	5 x 10 ¹	1,34 x 10 ²	4,2x10 ²	5 x 10 ¹	4,7 x 10 ¹	5 x 10 ¹	3 x 10 ²	3,56x10 ²
7dni	4	2,8 x 10 ¹	1,1 x 10 ¹	1,46 x 10 ²	2,3x10 ⁵	4,8 x 10 ¹	9,6 x 10 ¹	5 x 10 ¹	5 x 10 ²	3x10 ⁶
28°C										
0h	5,6 x 10 ¹	1,4 x 10 ³	5,6 x 10 ¹	1,4 x 10 ³	1,4 x 10 ³	0	0	0	0	0
24h	4 x 10 ¹	1 x 10 ²	6 x 10 ¹	3,6 x 10 ³	6x10 ⁴	1,9 x 10 ¹	9	5 x 10 ¹	4,2 x 10 ³	5x10 ³
48h	4 x 10 ¹	1,2 x 10 ¹	1 x 10 ¹	0	4,8x10 ⁵	1 x 10 ¹	6 x 10 ¹	3 j	4,5 x 10 ³	1,2x10 ⁶
72h	5 x 10 ¹	1,7 x 10 ¹	2	2,06 x 10 ²	2,68x10 ⁶	5 x 10 ¹	1,66 x 10 ²	0	1,82 x 10 ⁵	1,52x10 ⁶
7dni	5 x 10 ¹	0	1	3,74 x 10 ²	2x10 ⁵	1,1 x 10 ¹	3,9 x 10 ¹	0	1,36 x 10 ²	1x10 ⁵

Załącznik 45. Zmiany wartości RLU. ATP ogólne, seria 1 i 2, temp 4,15 i 28°C

	Ścieki oczyszczone			Ścieki oczyszczone z Biopreparatem			Ścieki oczyszczone po dezynfekcji ozonem			Ścieki oczyszczone po dezynfekcji ozonem z Biopreparatem		
	Seria 1	Seria 2		Seria 1	Seria 2		Seria 1	Seria 2		Seria 1	Seria 2	
	ogólne	ogólne	zewnątrzko mórkowe	ogólne	ogólne	zewnątrzko mórkowe	ogólne	ogólne	zewnątrzko mórkowe	ogólne	ogólne	zewnątrzko mórkowe
4°C												
0h	3 952 003	1 172 875	49 569	3 952 003	1 172 875	49 569	1 275 807	871 362	637 804	1 275 807	871 362	637 804
24h	1 395 040	1 117 008	41 796	1 926 992	1 363 575	99 501	989 724	1 238 446	1 222 817	1 179 680	530 039	511 331
48h	868 142	730 475	55 942	2 458 531	1 717 055	51 209	780 767	1 293 705	1 181 383	727 777	540 132	10 708
72h	860 483	789 834	25 560	1 440 198	1 068 021	58 153	740 022	1 208 355	1 201 585	558 431	520 986	542 774
7dni	990 334	358 284	55 479	3 174 545	1 294 487	59 088	699 208	730 517	776 763	888 780	394 752	370 630
15°C												
0h	3 952 003	1 172 875	49 569	3 952 003	1 172 875	49 569	1 275 807	871 362	637 804	1 275 807	871 362	637 804
24h	1 112 239	864 462	812 826	8 354 863	2 100 896	112 059	580 910	871 362	637 804	395 343	557 878	497 915
48h	1 568 993	663 104	43 992	5 629 583	2 211 423	118 144	3 811 870	963 604	1 016 303	7 075 239	5 524 612	50 934
72h	3 014 840	548 959	24 489	2 426 344	1 274 830	70 708	12 114 011	801 724	705 447	7 252 205	11 886 145	39 770
7dni	2 249 910	645 104	64 230	4 341 501	1 485 851	96 717	8 554 584	13 872 388	241 247	6 949 811	10 304 816	81 015
28°C												
0h	3 952 003	1 172 875	49 569	3 952 003	1 172 875	49 569	1 275 807	871 362	637 804	1 275 807	871 362	637 804
24h	1 962 509	753 763	50 037	2 549 536	2 311 587	62 338	12 734 864	4 38 561	27 668	4 188 176	13 116 823	15 847
48h	4 892 479	379 362	32 065	4 155 019	1 877 343	40 046	12 685 158	1 203 223	27 236	5 362 087	15 006 157	65 556
72h	1 417 698	859 945	16 944	1 084 006	2 646 956	79 203	5 124 362	910 905	33 363	1 242 512	9 846 372	65 778
7dni	531 498	438 781	30 999	2 480 151	3 878 877	95 044	1 581 625	1 001 102	30 644	1 655 543	4 488 414	96 382

Załącznik 46. Analiza FCM. Próby po ozonowaniu i z dodatkiem biopreparatu inkubowane w temperaturze 4 °C

		Temp.	1 Reg.	1 Reg. [%]	2 Reg.	2 Reg. [%]	3 Reg.	3 Reg. [%]
0h	Ścieki oczyszczone	4°C	220 683	60	150 112	40		
24h			126 402	30	144 048	34		
48h			66 106	28	190 685	39		
72h			70 808	29	105 357	43		
7 dni			59 394	33	103 091	58		
0h	Ścieki oczyszczone z biopreparatem	4°C						
24h			146 967	46	125 676	39		
48h			43 503	26	58 349	34		
72h			73 661	28	86 189	33		
7 dni			77 444	37	109 542	52	22 913	11
0h	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji ozonem	4°C						
24h			4 847	66	405	5		
48h			8 170	69	6 280	5		
72h			12 968	48	5 909	21		
7 dni			5 769	80	1 062	14	309	4
0h	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji ozonem z biopreparatem	4°C						
24h			12 083	69	534	4		
48h			6 418	57	339	3		
72h			18 192	62	1 040	3		
7 dni			0 576	89	881	9	120	1
0h	Ścieki oczyszczone	15°C	220 683	60	150 112	40		
24h			84 083	33	96 026	38		
48h			48 683	24	73 547	36	10 818	5
72h			58 235	22	93 310	36	26 538	10
7 dni			56 873	39	70 687	49	16 295	10
0h	Ścieki oczyszczone z biopreparatem	15°C						
24h			58 466	31	64 853	34		
48h			51 499	22	88 115	37	13 757	5
72h			55 757	24	87 995	33	25 820	9
7 dni			57 168	30	90 450	5	44 908	2

0h	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji ozonem	15°C						
24h			5 963	61	501	5		
48h			6 529	53	1 737	14	526	4
72h			4 276	2	10 593	6	99 034	56
7 dni			11 185	6	118 534	6	59 720	3
0h	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji ozonem z biopreparatem	15°C						
24h			7 220	47	117	0		
48h			8 110	10	3 57	4	53 551	70
72h			20 274	8	77 745	33	109 492	47
7 dni			24 261	10	77 160	3	145 282	6
0h	Ścieki oczyszczone	28°C	220 683	60	150 112	40		
24h			74 283	39	96 026	43		
48h			37 819	21	60 730	33	21 320	11
72h			33 520	23	42 160	29	12 181	8
7 dni			25 444	59	10 632	2	7 122	2
0h	Ścieki oczyszczone z biopreparatem	28°C						
24h			53 036	25	68 602	33		
48h			41 368	21	58 659	29	33 505	17
72h			87 002	31	54 079	19	25 797	9
7 dni			34 647	47	18 938	3	20 285	3
0h	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji ozonem	28°C						
24h			4 999	59	603	21		
48h			16 183	24	14 230	22	29 199	45
72h			159 984	27	2 122 747	21	20 130	35
7 dni			4 915	29	5 280	3	6 765	4
0h	Ścieki oczyszczone po dezynfekcji ozonem z biopreparatem	28°C						
24h			56 376	62	10 526	30	192 793	21
48h			13 419	7	72 760	41	80 040	45
72h			27 156	13	47 777	22	99 149	47
7 dni			19 599	27	12 261	2	41 802	6

Załącznik 47. Wpływ długości/dawek ozonowania na barwę ścieków

barwa	[Pt mg/l]
Ścieki oczyszczone	55
1 min./dm ³	23
3min./ dm ³	18
5min./ dm ³	13
7min./ dm ³	12
9min./ dm ³	9

9. Abstrakt

W Europie niemal 88% wody wykorzystywanej do różnych celów, w tym rolniczych i przemysłowych, pochodzi z rzek i wód podziemnych. W wielu krajach obserwuje się sezonowe braki słodkiej wody oraz pogorszenie jej jakości. W związku z tym, ponowne wykorzystanie ścieków staje się jedną z kluczowych strategii poszukiwania nowych źródeł wody. Skuteczność procesów oczyszczania ścieków nie zawsze zapewnia też optymalną jakość wód w odbiornikach. Woda odprowadzana z oczyszczalni może nadal zawierać zanieczyszczenia chemiczne i mikrobiologiczne, które mogą negatywnie wpływać na ekosystemy wodne oraz zdrowie publiczne. Zły stan mikrobiologiczny wód prowadzi do corocznego zamykania kąpielisk, zwłaszcza latem, podczas wysokich temperatur. Jest to problem o zasięgu globalnym, wynikający m.in. z niewystarczającego oczyszczania ścieków i ich wpływu na jakość wód powierzchniowych.

Kluczowym wyzwaniem jest osiągnięcie takiej jakości oczyszczania, która minimalizuje negatywne oddziaływanie na środowisko wodne, jednocześnie umożliwiając ponowne wykorzystanie wody w sposób zrównoważony i bezpieczny. W tym kontekście, zastosowanie biopreparatów jako ekologicznego środka zyskuje na znaczeniu. Biopreparaty mają potencjał do poprawy jakości mikrobiologicznej oczyszczonych ścieków oraz pozytywnego wpływu na procesy rekultywacji wód. To bezpośrednio wspiera realizację idei obiegu zamkniętego i zwiększa potencjał ponownego wykorzystania ścieków w cyklu. Ozonowanie i dezynfekcja promieniowaniem UV są już dziś kluczowymi metodami stosowanymi w procesach oczyszczania ścieków, mającymi na celu poprawę jakości wody oraz ochronę zdrowia publicznego i środowiska. Jednak przeprowadzone badania wykazały brak długotrwałe utrzymującej się stabilności mikrobiologicznej i odtwarzanie się mikroflory. W niektórych przypadkach najbardziej efektywnym rozwiązaniem może okazać się zastosowanie metod łączonych, takich jak kombinacja ozonowania i promieniowania UV w połączeniu z biopreparatami.

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej dysertacji doktorskiej potwierdziły, że możliwa jest higienizacja ścieków bytowych pochodzących z miejskich, komunalnych oczyszczalni ścieków. Proces higienizacji, rozumiany jako poprawa jakości mikrobiologicznej ścieków oczyszczonych, jest jednak możliwy tylko przy zachowaniu ściśle określonych warunków.

Abstract eng.

In Europe, nearly 88% of water used for various purposes, including agricultural and industrial, comes from rivers and groundwater. Many countries are experiencing seasonal shortages of fresh water and deterioration of its quality. As a result, wastewater reuse is becoming one of the key strategies for finding new sources of water. The efficiency of wastewater treatment processes also does not always ensure optimal water quality in receiving waters. Water discharged from wastewater treatment plants can still contain chemical and microbiological contaminants that can negatively affect aquatic ecosystems and public health. The poor microbiological state of the waters leads to annual closures of bathing areas, especially in summer, during high temperatures. This is a global problem, resulting, among other things, from insufficient wastewater treatment and its impact on surface water quality.

The key challenge is to achieve a quality of treatment that minimizes negative impacts on the aquatic environment, while allowing water to be reused in a sustainable and safe manner. In this context, the use of biopreparations as an ecological measure is gaining importance. Biopreparations have the potential to improve the microbiological quality of treated wastewater and positively influence water reclamation processes. This directly supports the realization of the closed-loop concept and increases the potential for wastewater reuse in the cycle. Ozonation and UV disinfection are already key methods used in wastewater treatment processes to improve water quality and protect public health and the environment. However, studies have shown a lack of long-term microbial stability and microflora reproduction. In some cases, combined methods, such as a combination of ozonation and UV radiation combined with biopreparations, may be the most effective solution.

Research carried out as part of this doctoral dissertation has confirmed that hygienization of domestic wastewater from urban, municipal wastewater treatment plants is possible. However, the process of hygienization, understood as improving the microbiological quality of treated wastewater, is possible only under strict conditions.

10. Literatura

- [1] The Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), **2013**, Climate change 2013: The physical science basis, *In Contribution of Working Group I to the 5th Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*; Cambridge University Press: Cambridge, UK.
- [2] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady UE 2020/741 z dnia 25 maja 2020 r. w sprawie minimalnych wymogów dotyczących ponownego wykorzystania wody, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TPDF/?uri=CELEX:32020R0741&from=PL>.
- [3] Komisja UE, **2018**, Dokument roboczy służb komisji w sprawie minimalnych wymogów dot. ponownego wykorzystania wody, Bruksela **2018**, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:52018SC0250&from=LV>.
- [4] NIK, Departament Rolnictwa i Rozwoju Wsi, **2020**, Przeciwdziałanie niedoborom wody w rolnictwie, (<https://www.nik.gov.pl/plik/id,23582,vp,26318.pdf>).
- [5] NIK, **2021**, Zapobieganie suszy rolniczej bez spójnego planu, <https://www.nik.gov.pl/aktualnosci/zapobieganie-suszy-rolniczej.html>.
- [6] Qadir M., Sharma B.R., Bruggeman A., Choukr-Allah R., Karajeh F., **2007**, Non-conventional water resources and opportunities for water augmentation to achieve food security in water scarce countries, *Agricultural Water Management*, Vol. 87, Issue 1, p. 2–22, ISSN 0378-3774, DOI:10.1016/j.agwat.2006.03.018; (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378377406001065>).
- [7] European Environment Agency, **2021**, Zapewnienie czystych wód ludziom i przyrodzie (<https://www.eea.europa.eu/pl/sygnal42y/sygnaly-2020/articles/zapewnienie-czystych-wod-ludziom-i-przyrodzie>).
- [8] Ministerstwo Klimatu i Środowiska, **2021**, Najnowszy raport GUS – Polska na 24 miejscu w Unii Europejskiej pod względem odnawialnych zasobów wody słodkiej, <https://www.gov.pl/web/susza/najnowszy-raport-gus--polska-na-24-miejscu-w-unii-europejskiej-pod-wzglem-odnawialnych-zasobow-wody-slodkiej> [dostęp na dzień: 21.03.2024r.
- [9] Rijsberman F.R., Water scarcity: Fact or fiction?, **2006**, *Agricultural Water Management*, Vol. 80, Issues 1–3, p. 5–22, ISSN 0378-3774, DOI: 10.1016/j.agwat.2005.07.001, (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378377405002854>).
- [10] Sato T., Qadir M., Yamamoto S., Endo T., Zahoor A., **2013**, Global, regional, and country level need for data on wastewater generation, treatment, and use, *Agricultural Water Management*, Vol. 130, p. 1–13, ISSN 0378-3774, DOI:10.1016/j.agwat.2013.08.007. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378377413002163>).
- [11] United Nations, **2023**, Raport ONZ o Światowym Rozwoju Wody, <https://www.unwater.org/publications/un-world-water-development-report>.
- [12] Strona internetowa: <https://www.meiko.pl/pl/dzielimy-sie-wiedza-meiko/blog/zasoby-wody-oszczednosc-wody> (dostęp na dzień: 10.10.2023r.)
- [13] Abdel-Megeed A., El-Nakieb, F.A., **2008**, Bioremediation of dimethoate by effective microorganisms in Egyptian contaminant water, *J Applied Sci Res.*, 4, p. 1–10. (https://www.researchgate.net/publication/285444700_Bioremediation_of_dimethoate_by_effective_microorganisms_in_Egyptian_contaminant_water).

-
- [14] Sekaran V., Balaji C., Bhagavathipushpa T., **2005**, Technical Note: Evaluation of Effective Microorganisms (EM) In Solid Waste Management. *Electronic Green J., UCLA Library, UCLA*, 1, p. 1–5; DOI:10.5070/G312110589 (https://www.researchgate.net/publication/284565105_Technical_Note_Evaluation_of_Effective_Microorganisms_EM_In_Solid_Waste_Management).
- [15] Elshafai M., Elmoteleb E., **2017**, Investigate the effect of effective microorganism (em) on improving the quality of sewage water from al-gabal al-asfar area in Egypt, (https://www.researchgate.net/publication/322775316_INVESTIGATE_THE_EFFECT_OF_EFFECTIVE_MICROORGANISM_EM_ON_IMPROVING_THE_QUALITY_OF_SEWAGE_WATER_FROM_AL-GABAL_AL-ASFAR_AREA_IN_EGYPT).
- [16] Jimenez, B., Asano, T., **2008**, Water Reclamation and Reuse around the World. In: Jimenez, B. and Asano, T., Eds., *Water Reuse: An International Survey of Current Practice, Issues and Needs*, IWA Publishing, London, p. 648.
- [17] Scott C.A., Faruqi N.I., Raschid-Sally L., **2024**, Wastewater use in irrigated Agriculture, *Coordinating the Livelihood and Environmental Realities*, IRC Wasch, Chapter 4, (<https://www.ircwash.org/sites/default/files/Scott-2004-Wastewater.pdf>).
- [18] Raschid-Sally L., Jayakody P., **2008**, Drivers and Characteristics of Wastewater Agriculture in Developing Countries: Results from a Global Assessment, Colombo, Sri Lanka. *IWMI Research Report 127, International Water Management Institute*, Colombo.
- [19] IUNG-PIB Puławy, **2019**, Ekspertyza „Wyznaczenie obszarów w różnym stopniu zagrożonych wystąpieniem suszy w Polsce na potrzeby wdrażania operacji „Modernizacja gospodarstw rolnych”.
- [20] Zamorska J., Piech A., **2014**, Wpływ oczyszczonych ścieków na jakość wód w odborniku, *Zaopatrzenie w wodę, jakość i ochrona wód*, p. 367–378, (https://water.put.poznan.pl/images/fullpapers/2014/OCHRONA_JAKOSC_WOD/367_WODA2014_WODA_2014.pdf).
- [21] Państwowe Gospodarstwo Wodne Wody Polskie, **2019**, Gospodarka ściekowa w Polsce w latach 2017-2018
- [22] Karta Praw Podstawowych Unii Europejskiej Stan prawny aktualny na dzień: 27.08.2023.
- [23] Mazurkiewicz J., Mazur A., Mazur R., Chmielowski K., Czekala W., Janczak D., **2020**, The Process of Microbiological Remediation of the Polluted Słoneczko Reservoir in Poland: For Reduction of Water Pollution and Nutrients Management, *Water*, 12(11):3002, DOI:10.3390/w12113002 (<https://www.mdpi.com/2073-4441/12/11/3002>).
- [24] Zamorska J, Kiełb-Sotkiewicz I., **2021**, A Biological Method of Treating Surface Water Contaminated with Industrial Waste Leachate. *Water*, 13(24):3644, DOI:10.3390/w13243644 (<https://www.mdpi.com/2073-4441/13/24/3644>).
- [25] KZGW, **2010**, Poradnik dotyczący gospodarki ściekowej w kontekście wykonania KPOŚK, Warszawa.
- [26] Dyrektywa Rady 91/271/EWG – dyrektywa Rady 91/271/EWG z dnia 21 maja 1991 r. dotycząca oczyszczania ścieków komunalnych (Dz. Urz. WE L 135 z 30.05.1991, str. 40 – Polskie wydanie specjalne, rozdz. 15, t. 2, str. 26; Dz. Urz. WE L 67 z 07.03.1998, str. 29 – Polskie wydanie specjalne, rozdz. 15, t. 4, str. 27; Dz. Urz. WE L 284 z 31.10.2003, str. 1 – Polskie wydanie specjalne, rozdz. 1, t. 4, str. 447; Dz. Urz. WE L 311 z 21.11.2008, str. 1; Dz. Urz. WE L 353 z 28.12.2013, str. 8).

[27] Dyrektywa 2000/60/EC Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 23 października 2000 r. ustanawiająca ramy wspólnotowego działania w dziedzinie polityki wodnej (Dz. Urz. WE L 327 z 22.12.2000, str. 1, z późn. zm.; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 15, t. 5, str. 275).

[28] Strona internetowa: <https://www.europarl.europa.eu/topics/pl/article/20200618STO81513/zielony-lad-klucz-do-neutralnej-klimatycznie-i-zrownowazonej-ue> (dostęp na dzień: 10.01.2024r.).

[29] Strona internetowa: <https://www.consilium.europa.eu/pl/press/press-releases/2024/01/29/urban-wastewater-council-and-parliament-reach-a-deal-on-new-rules-for-more-efficient-treatment-and-monitoring/> (dostęp na dzień: 25.02.2024r.).

[30] Angelakis A.N., Bontoux L., **2001**, Wastewater reclamation and reuse in Eureau countries, *Water Policy*, Vol.3, Issue 1, p. 47–59, ISSN 1366-7017, DOI:10.1016/S1366-7017(00)00028-3, (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1366701700000283>).

[31] Komunikat prasowy Rady UE, **2020**, Odzyskana woda do nawadniania upraw: Rada przyjmuje nowe przepisy, <https://www.consilium.europa.eu/pl/press/press-releases/2020/04/07/water-reuse-for-agricultural-irrigation-council-adopts-new-rules/>.

[32] Dembek W., Marcinkowski P., Okruszko T., Pierzgalski E., Piniewski M., **2023**, Uwarunkowania wodne gospodarki żywnościowej w odniesieniu do strategii "Od pola do stołu", BNP PARIBAS (https://www.researchgate.net/publication/374265736_Uwarunkowania_wodne_gospodarki_zywnosci_owej_w_odniesieniu_do_strategii_Od_pola_do_stolu).

[33] Rozporządzenie MŚ z dnia 11 lutego 2004 r. w sprawie klasyfikacji dla prezentowania stanu wód powierzchniowych i podziemnych, sposobu prowadzenia monitoringu oraz sposobu interpretacji wyników i prezentacji stanu tych wód (Dz.U. Nr 32, poz. 284).

[34] Michalkiewicz M., Jeż-Walkowiak J., Dymaczewski Z., Sozański M.M., **2011**, Dezynfekcja ścieków, *Inżynieria Ekologiczna*, nr 24 (<http://www.archive.ecoet.com/pdf/24/4.pdf>).

[35] Ustawa z dnia 7 czerwca 2001 r. o zbiorowym zaopatrzeniu w wodę i zbiorowym odprowadzaniu ścieków (Dz. U. Nr 123 z 2006 r., poz. 858, ze zm.) - art. 9 pkt 6.

[36] Angelakis A.N., Koutsoyiannis D., Tchobanoglous G., **2005**, Urban wastewater and stormwater technologies in the Ancient Greece, *Wat. Res.*, 39(1), p. 210–220.

[37] Angelakis A.N., Kavoulaki E., Dialynas M. G., **2014**, Sanitation and stormwater and wastewater technologies in Minoan Era. In *Evolution of Sanitation and Wastewater Management through the Centuries*; Angelakis, A.N. and Rose, J.B., Eds.; *IWA Publishing*: London.

[38] De Feo G., Antoniou G., Han Fardin H.F., El-Gohary F., Zheng X.Y., Reklaityte I., Butler D., Yannopoulos S., Angelakis A. N., **2014**, History of sanitary sewers worldwide. *Sustainability*.

[39] Tzanakakis V.E., Koo-Oshima S., Haddad M., Apostolidis N., Angelakis A.N., **2014**, The history of land application and hydroponic systems for wastewater treatment and reuse. In *Evolution of Sanitation and Wastewater Management through the Centuries*; A. N. Angelakis and J. B. Rose, Eds.; *IWA Publishing*, London.

[40] Stanbridge H.H., **1976**, History of Sewage Treatment in Britain, *Part 5 Land Treatment. The Institute of Water Pollution Control*, Maidstone, Kent, England.

[41] US EPA, **1979**, A history of land application as a treatment alternative. *U.S Environmental Protection Agency*, EPA 430/9-79-012, Apr. 1979.

-
- [42] Tzanakakis V.E., Paranychianakis N.V., Angelakis A.N., **2007**, Soil as a wastewater treatment system: Historical development. *Wat. Sci. Techn., Water Supply* 7(1), p.67–76.
- [43] California State Board of Health, **1918**, Regulations governing use of sewage for irrigation purposes. California State Board of Health, Sacramento, California, USA.
- [44] California Department of Public Health, **2014**, Regulations Related to Recycled Water, (http://www.cdph.ca.gov/certlic/drinkingwater/Documents/Lawbook/RWregulations_20140618.pdf).
- [45] Metcalf & Eddy, **2004**, Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. IV edition.
- [46] Klisowska A., **2019**, Ponowne wykorzystanie wody w rolnictwie – na podstawie projektowanego rozporządzenia unijnego, Departament Gospodarki Wodnej i Żeglugi Śródlądowej.
- [47] Waligóra G., **2023**, Jak to jest z tym ponownym wykorzystaniem ścieków?; artykuł na linkedIn
- [48] Ricart S., Rico A.M., **2019**, Assessing technical and social driving factors of water reuse in agriculture: A review on risks, regulation and the yuck factor, *Agricultural Water Management*, Vol. 217, p. 426–439, ISSN 0378-3774, DOI:10.1016/j.agwat.2019.03.017, (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378377418311405>).
- [49] The Metropolitan Water District of Southern California, Pure Water, <https://pl.mwdh2o.com/budowanie-lokalnych-dostaw/czysta-woda-po%C5%82udniowa-Kalifornia/>.
- [50] Bennett A., **2015**, Innovation trends in food and beverage filtration applications, *Filtration + Separation*, Vol.52, Issue 2, p. 28–33, ISSN 0015-1882, DOI:10.1016/S0015-1882(15)30091-4., (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015188215300914>)
- [51] Angelakis A.N., Gikas P., **2014**, *Water Utility Journal* 8, p. 67–78, (https://www.ewra.net/wuj/pdf/WUJ_2014_08_07.pdf).
- [52] Ryan S., **2016**, Europe Moves Forward on Water Reuse World Water: Water Reuse & Desalination. *Spring*, (https://www.asersagua.es/Asersa/Documentos/Water_Reuse_in_Europe_JWRD.pdf).
- [53] Strona internetowa: <https://www.globalwaterintel.com/global-water-intelligence-magazine/11/7/general/singapore-aims-for-1-million-m3-d-of-desal> (dostęp na dzień: 21.03.2024r.).
- [54] Jasim S.Y., Saththasivam J., Loganathan K., Ogunbiyi O.O., Sarp S., **2016**, Reuse of Treated Sewage Effluent (TSE) in Qatar, *Journal of Water Process Engineering*, Vol. 11, p. 174–182, ISSN 2214-7144, DOI:10.1016/j.jwpe.2016.05.003, (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214714416301866>).
- [55] Malej J., **2008**, Wysoko sprawne oczyszczalnie ścieków a zagrożenia kąpielisk publicznych. *Wodociągi – Kanalizacja*, 57(11), p. 48–49.
- [56] Angelakis A.N., Bontoux L., **2001**, Wastewater reclamation and reuse in European countries, *Water Policy* 3, p. 47–59.
- [57] FAO-AQUASTAT, **2012**. Global information system on water and agriculture. (<http://www.fao.org/nr/water/aquastat/main/index.stm>).
- [58] Rodríguez-Villanueva P., Sauri D., **2021**, Wastewater Treatment Plants in Mediterranean Spain: An Exploration of Relations between Water Treatments, Water Reuse, and Governance, *Water*, 13(12):1710, DOI:10.3390/w13121710 (<https://www.mdpi.com/2073-4441/13/12/1710>).

-
- [59] Esteban R.I., Ortega E., Batanero G., Quintas L., **2010**, Water reuse in Spain: data overview and costs estimation of suitable treatment trains. *Desalination* 263, p. 1–10.
- [60] BOE. *Real Decreto 1620/2007, de 7 de Diciembre, Por el Que se Establece el Régimen Jurídico de la Reutilización de las Aguas Depuradas*; N294; Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado: Madrid, Spain, 2007; (<https://www.boe.es/buscar/pdf/2007/BOE-A-2007-21092-consolidado.pdf>).
- [61] Von Houtte E., Vebauwhede J., **2012**, Sustainable groundwater management using reclaimed water: the Torreele/St-André case in Flanders, Belgium, *Journal of Water Supply: Research and Technology-Aqua*, Vol. 61, Issue 8, p. 473–483, (<https://iwaponline.com/aqua/article-abstract/61/8/473/31186/Sustainable-groundwater-management-using-reclaimed?redirectedFrom=PDF>).
- [62] Group B., Asia S., **2012**, Pall supplies Qatar Petroleum with Aria water treatment system, *Membr. Technol.* 3–4, DOI:10.1016/s0958-2118(12)70048-4.
- [63] El Emadi K., Kerim G. A., Hashim M., **2010**, Development of Al Dahkhirah Sewage Treatment Works to Reuse Treated Water for Construction Works, *Elsevier B.V.*, Qatar, DOI:10.1016/S1876-0147(10)02007-0.
- [64] ASHGAL, **2014**, Treated Sewage Effluent (TSE) Networks In Qatar, in: *Dist. Cool. Work. Towar. Coop. Dist. Cool. Soc KAHRAMAA*.
- [65] Enssle C., Freedman J.O.N., **2014**, Addressing Water Scarcity in Saudi Arabia, *Policy Options for Continued Success*.
- [66] Arab World, Water Reuse In The Arab World, **2011**, From Principle To Practice, in: Expert Consult Wastewater Manag. Arab World, Dubai-UAE.
- [67] Mesa-Pérez E, Berbel J., **2020**, Analysis of Barriers and Opportunities for Reclaimed Wastewater Use for Agriculture in Europe, *Water*, 12(8):2308, DOI:10.3390/w12082308 (<https://www.mdpi.com/2073-4441/12/8/2308>).
- [68] European Environment Agency, **2017**, Urban WasteWater Treatment in Europe, (<https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/urban-waste-water-treatment/urban-waste-water-treatment-assessment-5>).
- [69] European Commission, **2019**, Evaluation of the Urban Waste Water Treatment Directive; *Publications Office of the European Union*: Luxembourg, p. 186.
- [70] European Commission, **2019**, Fitness Check of the Water Framework Directive and the Floods Directive; *Publications Office of the European Union*: Luxembourg, p. 176.
- [71] Paranychianakis N.V., Angelakis A.N., **2009**, Statistics on water and wastewater sectors from European countries. In: Proc. of 2nd IWA Conference on Water Economics, Statistics, and Finance, 3–5 July, Alexandroupolis, II: p. 669–680.
- [72] Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), **2008**. OECD Environmental data: Compendium 2006–2008, (<http://www.oecd.org/dataoecd/22/55/41878136.pdf>).
- [73] UN, **2012**. Population connected to wastewater collecting system, (<http://unstats.un.org/unsd/environment/wastewater.htm>)
- [74] Pichel N., Pichel M., Vivar M. Fuentes, **2019**, The problem of drinking water access: A review of disinfection technologies with an emphasis on solar treatment methods, *Chemosphere*, Vol. 218, p.

[75] The World Bank, **2012**, Renewable Energy Desalination An Emerging Solution to Close the Water Gap in the Middle East and North Africa, DOI:10.1596/978-0-8213-8838-9.

[76] The United Nations World, 2012, Facts and Figure: Managing Water under Uncertainty and Risk From The United Nations World Water Development Report 4.

[77] Droogers P., Immerzeel W.W., Terink W., Hoogeveen J., Bierkens M.F.P., Van Beek L.P.H. et al., **2012**, Water resources trends in middle east and north africa towards 2050, *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 16, p. 3101–3114, DOI:10.5194/hess-16-3101-2012.

[78] Michel D., Pandya A., Hasnain S.I., Sticklor R., Panuganti S., **2012**, Water Challenges and Cooperative Response in the Middle East and North Africa, *U.S.-Islamic World Forum.*, p. 11–15.

[79] European Environment Agency, **2020**, Zapewnienie czystych wód ludziom i przyrodzie, <https://www.eea.europa.eu/pl/sygnal42y/sygnaly-2020/articles/zapewnienie-czystych-wod-ludziom-i-przyrodzie> (dostęp na dzień: 14.02.2023)

[80] Konwencja sporządzona w Helsinkach dnia 9 kwietnia **1992 r.** o ochronie środowiska morskiego obszaru Morza Bałtyckiego (<https://sip.lex.pl/akty-prawne/dzu-dziennik-ustaw/konwencja-o-ochronie-srodowiska-morskiego-obszaru-morza-baltyckiego-16866799>).

[81] Główny Urząd Statystyczny, Ochrona Środowiska 2017, 2018, 2019,2020,2021, 2022,2023, Warszawa.

[82] Główny Urząd Statystyczny, Ekonomiczne aspekty ochrony środowiska 2019, Warszawa.

[83] Państwowe Gospodarstwo Wodne Wody Polskie, **2022**, wyniki Państwowego Monitoringu Środowiska w zakresie Monitoringu Jakości Wód (<https://mjwp.gios.gov.pl/wyniki-badan/wyniki-badan-2022.html>).

[84] Saravanan A., Kumar P.S., Jeevanantham S., Karishma S., Tajsabreen B., Yaashikaa P.R., Reshma B., **2021**, Effective water/wastewater treatment methodologies for toxic pollutants removal: Processes and applications towards sustainable development, *Chemosphere*, Vol. 280, 130595, ISSN 0045-6535, DOI:10.1016/j.chemosphere.2021.130595 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653521010663>).

[85] Ilias A., Panoras A., Angelakis A.N., **2014**, Water recycling and reuse in Hellas with emphasis on the Thessaloniki Project, *Sustainability*; 6, p. 2876–2892.

[86] Strona internetowa: <https://eblueplanet.pl/content/48-ozonowanie-sciekow> (dostęp na dzień: 21.03.2024r.).

[87] Bohra D.L., Modasiya V., Bahura C.K., **2012**, The Distribution of Coliform Bacteria in Waste Water, *Microbiology Research*, 3(1):e2, DOI:10.4081/mr.2012.e2 (<https://www.mdpi.com/2036-7481/3/1/e2>).

[88] Kosarewicz O., Firlus J., Uniejewska G., **1999**, Usuwanie mikroorganizmów chorobotwórczych w oczyszczalniach ścieków miejskich, *GWITS*, t. 73, nr 8, p. 292–297.

[89] Budzińska K., Jurek A., Szejniuk B., Wroński G., **2011**, Skuteczność usuwania zanieczyszczeń bakteriologicznych w procesach oczyszczania ścieków z zastosowaniem stawów biologicznych, Śródkowo-Pomorskie Towarzystwo Naukowe Ochrony Środowiska, *Rocznik Ochrona Środowiska*, Tom 13, p.15919–15930.

[90] Rogowska J., Cieszynska-Semenowicz M., Ratajczyk W. et al., **2020**, Micropollutants in treated wastewater, *Ambio* 49, p. 487–503, DOI:10.1007/s13280-019-01219-5 (<https://link.springer.com/article/10.1007/s13280-019-01219-5>).

[91] Klavins M., Klavins L., Stabnikova O., Stabnikov V., Marynin A., Ansone-Bertina L., Mezulis M., Vaseashta A., **2022**, Interaction between Microplastics and Pharmaceuticals Depending on the Composition of Aquatic Environment, *Microplastics*; 1(3), p. 520–535, DOI:10.3390/microplastics1030037 (<https://www.mdpi.com/2673-8929/1/3/37>).

[92] Hope B.K., Pillsbury L., Boling B., **2012**, A state-wide survey in Oregon (USA) of trace metals and organic chemicals in municipal effluent, *Science of The Total Environment*, Vol. 417–418, p. 263–272, ISSN 0048-9697, DOI:10.1016/j.scitotenv.2011.12.028, (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969711014926>).

[93] Golovko O., Örn S., Söregård M., Frieberg K., Nassazzi W., Yin Lai F., Ahrens L., **2021**, Occurrence and removal of chemicals of emerging concern in wastewater treatment plants and their impact on receiving water systems, *Science of The Total Environment*, Vol. 754, p. 142122, ISSN 0048-9697, DOI:10.1016/j.scitotenv.2020.142122, (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969720356515>).

[94] Pascual-Benito M., Ballesté E., Monleón-Getino T., Urmeneta J., Blanch A.R., García-Aljaro C., Lucena F., **2020**, Impact of treated sewage effluent on the bacterial community composition in an intermittent mediterranean stream, *Environmental Pollution*, Vol. 266, Part 1, 115254, ISSN 0269-7491, DOI:10.1016/j.envpol.2020.115254, (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749120337891>).

[95] Mansfeldt C., Deiner K., Mächler E., Fenner K., Rik I., Eggen L., Stamm Ch., Schönenberger U., Walser J.C., Altermatt F., **2020**, Microbial community shifts in streams receiving treated wastewater effluent, *Science of The Total Environment*, Vol. 709, 135727, ISSN 0048-9697, DOI:10.1016/j.scitotenv.2019.135727, (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969719357225>).

[96] Naidoo S., Olaniran A.O., **2014**, Treated Wastewater Effluent as a Source of Microbial Pollution of Surface Water Resources, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(1), p. 249–270, DOI:10.3390/ijerph110100249 (<https://www.mdpi.com/1660-4601/11/1/249>).

[97] Mbangi J., Abia A.L.K., Amoako D.G. et al., **2020**, Quantitative microbial risk assessment for waterborne pathogens in a wastewater treatment plant and its receiving surface water body. *BMC Microbiol* 20, p. 346 DOI:10.1186/s12866-020-02036-7 (<https://link.springer.com/article/10.1186/s12866-020-02036-7>).

[98] Lemar G., Shahar S., Osmani A.R., **2021**, Influence of sewage treatment plant effluent on the presence of culturable pathogenic bacteria in the water body, *Biosci Biotech Res Asia*, 18(1) (<https://www.biotech-asia.org/vol18no1/influence-of-sewage-treatment-plant-effluent-on-the-presence-of-culturable-pathogenic-bacteria-in-the-water-body/>).

[99] Karri R.R., Ravindran G., Dehghani M.H., **2021**, Toxicity, and Their Consequences to Human Health, Editor(s): Rama Rao Karri, Gobinath Ravindran, Mohammad Hadi Dehghani, *Soft Computing Techniques in Solid Waste and Wastewater Management, Chapter 1 – Wastewater—Sources*, Elsevier, p. 3–33, ISBN 9780128244630, DOI:10.1016/B978-0-12-824463-0.00001-Xm, (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012824463000001X>).

[100] Szumilas T., Michalska M., Bartoszewicz M., **2001**, Charakterystyka bakteryjnego zanieczyszczenia ścieków komunalnych z dużej aglomeracji miejskiej i ocena stopnia redukcji tego

zanieczyszczenia w procesie biologicznego oczyszczania ścieków, *ROCZN. PZH*, t. 52, nr 2, p. 155–164

(http://wydawnictwa.pzh.gov.pl/roczniki_pzh/files/pzhissues/id221/Charakterystyka_bakteryjnego_zanieczyszczenia_sciekow_komunalnych_z_duzej_aglomeracji_miejskiej_i_ocena_stopnia_redukcji_tego_zanieczyszczenia_w_procesie_biologicznego.pdf).

[101] Kawamura K., Kaneko M., **1986**, Microbial quality of human wastes and treatment plant effluent, *Water Sci. Techn.* 18, p. 257.

[102] Dymaczewski Z., Oleszkiewicz J.A., Sozański M.M., **1997**, Poradnik eksploatatora oczyszczalni ścieków, *PZITS*, Poznań.

[103] Kaźmierczuk M., **1983**, Biologiczne skażenie osadów pochodzących z miejskich oczyszczalni ścieków. *Człowiek i Środowisko*, T. 7, p. 417.

[104] Łagód G., Sobczuk H., Suchorab Z., **2006**, Application of a saprobiontic microorganisms community analysis in the calibration of a model description of sewage self-purification in sewer systems, *Ecol Chem and Engine*, 13, p. 265–275.

[105] Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z., 2008, Mikrobiologia techniczna, Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności, tom II, PWN Warszawa, p. 150.

[106] Józwiakowski K., Kotulska M., **2006**, Charakterystyka technologii usuwania zanieczyszczeń w biologicznych stawach ściekowych, *Zesz. Nauk. AR im. H. Kollątaja w Krakowie*, 28, p. 434.

[107] Botero L., Montiel M., Estrada P., Villalobis M., Herrera L., **1997**, Microorganism removal in wastewater stabilization ponds in Maracaibo, Venezuela, *Water Science and Technology*, Vol. 35, 11÷12, p. 205–209.

[108] Varon M.R., **2003**, Waste stabilization ponds for wastewater treatment. (<http://www.irc.nl/page/8237>. 2003).

[109] Dizer H., Althoff H.N., Bartoba W., Dorau W., Grahmon A., Lopez-Pila S.H., Seidel K., **1993**, Inaktivierung von Bakterien Viren in Klarwerkablauf durch Flackungesfiltration. UV – Bestrahlung und Mikrofiltration in verschiedenen Pilotanlagen. Bericht zum Faschungsvoutraben A 2 – 1342 – 22 Institut fur Wasser – Boden und Lufthygiene des Bundesgesundheitsamtes, Berlin.

[110] Walczak M., Donderski W., **2007**, Elimination of Indicators (TC, FC, FS) and Enterobacteriaceae family bacteria during the sewage treatment process, *Polish Journal of Natura Science*, 22, 2, p. 294–304.

[111] Koivunen J., Siitonen A., Heinonen-Tanski H., **2003**, Elimination of enteric bacteria in biological-chemical wastewater treatment and tertiary filtration units, *Water Research*, 37, 3, p. 690–698.

[112] George I., Crop P.H., Servais P., **2002**, Fecal coliform removal in wastewater treatment plants studied by plate counts and enzymatic methods, *Water Research*, 36, 10, p. 2607–2617.

[113] Stampi S., de Luca G., Zanetti F., **2001**, Evaluation of the efficiency of peracetic acid in disinfection of sewage effluents. *J. Appl Microbiol.*, 91, p. 833–888.

[114] Koivunen J., Heinonen-Tanski H., **2005**, Paracetic acid (PAA) disinfection of primary, secondary and tertiary municipal wastewater. *Water Res.* 39, p. 4445–4453.

[115] Olańczuk-Neyman K., Geneja M., Quant B., Dembińska M., Kruczałak K., Kulbat E., Haustein E., Mikołajski S., Gielert M., **2003**, Elimination of the chemical and microbiological pollutants in the modernized wastewater treatment plant "East" in Gdansk. In: *Environmental Engineering Studies*. 270

Polish Research on the way to the EU, Ed.: L. Pawłowski, M. R. Dudzińska, A. Pawłowski. Kluwer Academic/ Plenum Publishers USA, p. 235–258.

[116] Olańczuk-Neyman K., Stosik-Fleszar H., Mikołajski S., **2001**, Elimination of indicator bacteria removal in wastewater treatment processes, *Polish Journal of Environmental Studies*, Vol.10, No 6.

[117] Olańczuk-Neyman K., Geneja M., Quant. B., Dembińska M., Kruczalak K., Kulbat E., Kulik-Kuziemska I., Mikołajski S., Gielert M., **2003**, Microbiological and Biological Aspects of the Wastewater Treatment Plant "East" in Gdansk, *Pol. J. Environm. Stud.*, Vol.12, No.6, p.747–757.

[118] Olańczuk-Neyman K., **2003**, Microbiological aspects of sewage disposal into marine waters, *Marine Engineering and Geotechnics 2*, p. 55–62.

[119] Bonde G.J., **1990**, Pollution of a marine environment, *Water Poll. Contr. Fed. Washington. 2*, p. 45.

[120] Vilanova X., Manero A., Cerdà-Cuéllar M., Blanch A.R., **2002**, The effect of a sewage treatment plant effluent on the faecal coliforms and enterococci populations of the reception river waters, *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 92, Issue 2, 1 p. 210–214, DOI:10.1046/j.1365-2672.2002.01508.x (<https://academic.oup.com/jambio/article-abstract/92/2/210/6721595>).

[121] EARSS- European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) Annual Report **2007**

[122] Anastasi E.M., Matthews B, Stratton H.M., Katouli M., **2012**, Pathogenic Escherichia coli Found in Sewage Treatment Plants and Environmental Waters, *Appl Environ Microbiol* 78, DOI:10.1128/AEM.00657-12 (<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aem.00657-12>).

[123] Ramaiah N., Rodrigues V., Alvares E., Rodrigues C., Baksh R., Jayan S., Mohandass C., Sewage-pollution indicator bacteria, National Institute of Oceanography, Dona Paula, Goa 403 004, India. (<https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=f371150a042075b32a9c7939d309bd25dd186f85>).

[124] Hamelin K. et al., **2007**, Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in Escherichia coli isolates from different aquatic ecosystems within St. Clair River and Detroit River areas, *Appl. Environ. Microbiol.* 73, p. 477–484.

[125] Hamelin K. et al., **2006**, A virulence and antimicrobial resistance DNA microarray detects a high frequency of virulence genes in Escherichia coli isolates from Great Lakes recreational waters, *Appl. Environ. Microbiol.* 72, p. 4200–4206.

[126] Hamilton M.J., Hadi A.Z., Griffith J.F., Ishii S., Sadowsky M.J., **2010**, Large scale analysis of virulence genes in Escherichia coli strains isolated from Avalon Bay, CA, *Water Res.*, 44, p. 5463–5473.

[127] Mühldorfer I. et al., **1996**, Characterization of Escherichia coli strains isolated from environmental water habitats and from stool samples of healthy volunteers, *Res. Microbiol.* 147, p. 625–635.

[128] Ram S., Vajpayee P., Shanker R., **2007**, Prevalence of multi-antimicrobial agent resistant Shiga toxin and enterotoxin producing Escherichia coli in surface waters of river Ganga, *Environ. Sci. Technol.*, 41, p. 7383–7388.

[129] Toval F., Köhler C.D., Vogel U., Wagenlehner F., Mellmann A., Fruth A., Schmidt M.A., Karch H., Bielaszewska M., Dobrindt U., **2014**, Characterization of Escherichia coli isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection, *J Clin Microbiol.*, 52(2), p. 407–418, DOI:10.1128/JCM.02069-13 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24478469>).

[130] Kubera Ł., Bakterie i wirusy chorobotwórcze, *Instytut Biologii Eksperymentalnej, Zakład Mikrobiologii UKW*, <https://www.ukw.edu.pl/download/16698/mikrobiologia> (dostęp na dzień: 15.11.2023r.).

[131] Quant B., Bray R., Olańczuk-Neyman K., Jankowska K., Kulbat E., Łuczkiwicz A., Sokołowska A., Fudala S., **2009**, Research on disinfection of treated sewage discharged into surface waters, *WIS POL*, Lublin Congress 3, Vol. 2. Brak numeru strony.

[132] Reinthaler F.F., Posch J., Feierl G., Wust G., Haas D., Ruckebauer G., Mascher F., Marth E., **2003**, Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge, *Watt. Res.*, Vol. 37, p. 1685–1690.

[133] Kay D., Crowther J., Stapleton C.M., Wyer M.D., Fewtrell L., Edwards A., Francis C.A., McDonald A.T., Watkins J., Wilkinson J., **2007**, Faecal indicator organism concentrations in sewage and treated effluents, *Water Res.* 42, p. 442–454.

[134] Shannon M.A., Bohn P.W., Elimelech M., Georgiadis J.G., Marinas B.J., **2008**, Science and technology for water purification in the coming decades, *Nature*, 452, 20.

[135] Kiełb-Sotkiewicz I., **2022**, Disinfection of treated wastewater, in: Water and Sewage in the Circular Economy Model, *Monograph MonGOS International Conference*, Krakow.

[136] Kocwa-Haluch R., **2001**, Wirusy i ich występowanie w wodach i ściekach, *Wydawnictwo Politechniki Śląskiej*.

[137] Li J., Liu J., Yu H., Zhao W., Xia X., You S., Zhang J., Tong H., Wei L., **2022**, Sources, fates and treatment strategies of typical viruses in urban sewage collection/treatment systems: A review, *Desalination*, Vol. 534, 115798, ISSN 0011-9164, DOI:10.1016/j.desal.2022.115798, (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011916422002533>).

[138] Papciak D., Zamorska J., Kiedryńska L., **2011**, Mikrobiologia i Biotechnologia w procesach oczyszczania wody, *Oficyna wydawnictwa PRz*, Rzeszów.

[139] Berg G., **1973**, Removal of viruses from sewage, effluents, and waters. I. A review, *Bull World Health Organ.*, 49(5), p. 451–60, (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2480995/>)

[140] Gholipour S., Ghalhari M.R., Nikaeen M., Rabbani D., Pakzad P., Miranzadeh M. B., **2022**, Occurrence of viruses in sewage sludge: A systematic review, *Science of The Total Environment*, Vol. 824, 153886, ISSN 0048-9697, DOI:10.1016/j.scitotenv.2022.153886, (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004896972009780>).

[141] Farhadkhani M., Nikaeen M., Yadegarfar G., Hatamzadeh M., Pourmohammadbagher H., Sahbaei Z., Rahmani H.R., **2018**, Effects of irrigation with secondary treated wastewater on physicochemical and microbial properties of soil and produce safety in a semi-arid area; *Water Res.*, 144, p. 356–364, DOI:10.1016/j.watres.2018.07.047.

[142] Gonzales-Gustavson E., Rusiñol M., Medema G., Calvo M., Girones R., **2019**, Quantitative risk assessment of norovirus and adenovirus for the use of reclaimed water to irrigate lettuce in Catalonia, *Water Res.*, p. 91–99, DOI:10.1016/j.watres.2018.12.070.

[143] Moazeni M., Nikaeen M., Hadi M., Moghim S., Mouhebat L., Hatamzadeh M., Hassanzadeh A., **2017**, Estimation of health risks caused by exposure to enteroviruses from agricultural application of wastewater effluents, *Water Res.*, 125, p. 104–113, DOI:10.1016/j.watres.2017.08.028.

[144] WHO. Number of deaths: WORLD by cause., (<http://apps.who.int/gho/data/node.main.CODWORLD?lang=en>) (dostęp na dzień: 15.12.2023r.).

-
- [145] Bogler A., Packman A., Furman A., Gross A., Kushmaro A., Ronen A., Dagot C., Hill C., Vaizel-Ohayon D., E. Morgenroth E., Bertuzzo E., Wells G., Kiperwas H.R., Horn H., Negev I., Zucker I., Bar-Or I., Moran-Gilad J., Balcazar J.L., Bibby K., Elimelech M., Weisbrod N., Nir O., Sued O., Gillor O., Alvarez P.J., Cramer S., Arnon S., Walker S., Yaron S., Nguyen T.H., Berchenko Y., Hu Y., Ronen Z., Bar-Zeev E., **2020**, Rethinking wastewater risks and monitoring in light of the COVID-19 pandemic, *Nat. Sustain.*, 3 p. 981–990, DOI:10.1038/s41893-020-00605-2.
- [146] Gholipour S., Mohammadi F., Nikaeen M., Shamsizadeh Z., Khazeni A., Sahbaei Z., Mousavi S.M., Ghobadian M., Mirhendi H., **2021**, COVID-19 infection risk from exposure to aerosols of wastewater treatment plants, *Chemosphere*, 273, 129701, DOI:10.1016/j.chemosphere.2021.129701.
- [147] Butarewicz A., **2013**, Organizmy chorobotwórcze w osadach ściekowych – ich wykrywanie i neutralizacja. *Wydawnictwo Politechniki Białostockiej*, Białystok.
- [148] Bień J.B., Wystalska K., **2011**, Osady ściekowe teoria i praktyka. *Wydawnictwo Politechniki Częstochowskiej*, Częstochowa, p. 27–36.
- [149] Campos C.J.A., Avant J., Lowther J., Till D., Lees D.N., **2016**, Human norovirus in untreated sewage and effluents from primary, secondary and tertiary treatment processes, *Water Research*, Vol. 103, p. 224–232, ISSN 0043-1354, DOI:10.1016/j.watres.2016.07.045, (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135416305590>).
- [150] Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 6 lutego 2015. w sprawie komunalnych osadów ściekowych Dz.U. 2023 poz. 23.
- [151] Strona internetowa <https://www.biologia.net.pl/organizmy/wirusy-wiroidy-priony.html> (dostęp na dzień: 13.11.2023r.).
- [152] Huang K., Mao Y., Zhao F. et al., **2018**, Free-living bacteria and potential bacterial pathogens in sewage treatment plants, *Appl Microbiol Biotechnol* 102, p. 2455–2464, DOI:10.1007/s00253-018-8796-9 (<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-018-8796-9>).
- [153] WHO, **2021**, Guidelines for drinking-water quality: microbial aspects, 4th edn. Geneva. (http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548151_eng.pdf).
- [154] Li B., Ju F., Cai L., Zhang T., **2015**, Profile and Fate of Bacterial Pathogens in Sewage Treatment Plants Revealed by High-Throughput Metagenomic Approach, *Environmental Science & Technology* 49 (17), p.10492–10502, DOI:10.1021/acs.est.5b02345 (<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.est.5b02345>).
- [155] Michałkiewicz M., Michałkiewicz M., **2003**, Pasożyty w wodzie, ściekach i osadach, *Gaz, Woda i Technika Sanitarna*. Przepis jest niepełny, brak numeru, stron.
- [156] Khan, F.M., Gupta, R., **2020**, Escherichia coli (E. coli) as an Indicator of Fecal Contamination in Groundwater: A Review, In: Jeon, H.Y. (eds) Sustainable Development of Water and Environment. ICSDWE 2020, Environmental Science and Engineering, *Springer, Cham.*, DOI:10.1007/978-3-030-45263-6_21, (https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-45263-6_21).
- [157] Papciak D., Zamorska J., **2005**, Podstawy biologii i biotechnologii środowiskowej, *Oficyna Wydawnictwa Prz*, Rzeszów.
- [158] Strona internetowa: www.pogorzedynowskie.pl, ocena jakości mikrobiologicznej wód Sanu, aktualizacja z dnia 24.04.2023r.
- [159] Pawlaczyk- Szpilowa M., **1980**, Mikrobiologia wody i ścieków, *Państwowe Wydawnictwo Naukowe*, Warszawa.

-
- [160] Al-Gheethi A.A., Efaq A.N., Bala J.D. et al., **2018**, Removal of pathogenic bacteria from sewage-treated effluent and biosolids for agricultural purposes, *Appl Water Sci* 8, 74, DOI:10.1007/s13201-018-0698-6 (<https://link.springer.com/article/10.1007/s13201-018-0698-6>).
- [161] Rheineimer G., **1987**, Mikrobiologia wód, Państwowe *Wydawnictwo Rolnicze i Leśne*, Warszawa.
- [162] Matusz A. **2023**, Dezynfekcja oczyszczonych ścieków, praca magisterska, Politechnika Rzeszowska.
- [163] Riley L.W., Remis R.S., Helgerson D., McGee H.B., Wells J.G., Davis B.R., Hebert R.J., Olcott E.S., Johnson L.M., Hargrett N.T., Blake P.A., Cohen M.L., **1983**, Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype, *New Engl J Med* 308(12), p. 681–685.
- [164] Al-Zubeiry A.H.S., **2005**, Microflora inhabiting raw sewage, secondary effluent and dewatered sludge in Ibb, Yemen Republic, *Ass Univ Bull Environ Res* 8(1), p. 1–16.
- [165] Jokinen C.C., Schreier H., Mauro W., Taboada E., Isaac-Renton J.L., Topp E., Edge T., Thomas J.E., Gannon V.P.J., **2010**, The occurrence and sources of *Campylobacter* spp., *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 in the Salmon River, British Columbia, Canada, *J Water Health* 8(2), p. 374–386.
- [166] Al-Gheethi A.A.S., Norli I., Kadir M.O., **2013**, Elimination of enteric indicators and pathogenic bacteria in secondary effluents and lake water by solar disinfection (SODIS), *J Water Reuse Desalination* 3(1), p. 39–46.
- [167] Al-Gheethi A.A.S., Ismail N., **2014**, Biodegradation of pharmaceutical wastes in treated sewage effluents by *Bacillus subtilis* 1556WTNC, *Environ Process* 1(4), p. 459–489.
- [168] Loo K.Y., Letchumanan V., Woan-Fei Law J., Pusparajah P., Goh B.H., Nurul-Syakima Ab Mutalib, Ya-Wen He, Learn-Han Lee, **2020**, Incidence of antibiotic resistance in *Vibrio* spp., *Reviews in Aquaculture*, Vol.12, Issue 4, p. 2590–2608, (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/raq.12460>).
- [169] Osunla A.C., Abioye O.E., Okoh A.I., **2021**, Distribution and Public Health Significance of *Vibrio* Pathogens Recovered from Selected Treated Effluents in the Eastern Cape Province, South Africa, *Water*, 13(7), p. 932, DOI:10.3390/w13070932 (<https://www.mdpi.com/2073-4441/13/7/932>).
- [170] Igbinsosa, E.O., Obi, C.L., Okoh, A.I., **2011**, Seasonal abundance and distribution of *Vibrio* species in the treated effluent of wastewater treatment facilities in suburban and urban communities of Eastern Cape Province, South Africa, *J Microbiol.* 49, p. 224–232, DOI:10.1007/s12275-011-0227-x (<https://link.springer.com/article/10.1007/s12275-011-0227-x>).
- [171] Okeyo A.N., Nontongana N., Fadare T.O., Okoh A.I., **2018**, *Vibrio* Species in Wastewater Final Effluents and Receiving Watershed in South Africa: Implications for Public Health, *International Journal of Environmental, Research and Public Health*, 15(6):1266, DOI:10.3390/ijerph15061266 (<https://www.mdpi.com/1660-4601/15/6/1266>).
- [172] Olańczuk-Neyman K., Quant B., **2015**, Dezynfekcja ścieków, *Seidel-Przywecki Sp. z oo Wydawnictwo*, Warszawa.
- [173] Casanovas-Massana A., Pedra G.G., Wunder E.A., Diggle P.J., Begon M., Ko A.I., **2018**, Quantification of *Leptospira interrogans* Survival in Soil and Water Microcosms, *Appl Environ Microbiol* 84, (e00507-18, DOI:10.1128/AEM.00507-18 (<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aem.00507-18>)).

[174] Casanovas-Massana A., Neves Souza F., Curry M., de Oliveira D., de Oliveira A.S., Eyre M.T., Santiago D., Aguiar Santos M., Serra R.M.R., Lopes E., IA Xavier, B. Diggle P.J., Wunder E.A., Reis M.G., Ko A.I., Costa F., **2021**, Effect of Sewerage on the Contamination of Soil with Pathogenic *Leptospira* in Urban Slums, *Environmental Science & Technology* 55 (23), p. 15882–15890, DOI: 10.1021/acs.est.1c04916 (<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.est.1c04916>).

[175] Casanovas-Massana A., Costa F., Riediger I.N., Cunha M., de Oliveira D., Mota D.C., Sousa E., Querino V.A., Nery N., Reis M.G., Wunder E.A., Diggle P.J., Ko A.I., **2018**, Spatial and temporal dynamics of pathogenic *Leptospira* in surface waters from the urban slum environment, *Water Research*, Vol. 130, p.176–184, ISSN 0043-1354, DOI:10.1016/j.watres.2017.11.068, (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135417309958>).

[176] Guo, F., Zhang, T., Li, B. et al., **2019**, Mycobacterial species and their contribution to cholesterol degradation in wastewater treatment plants, *Sci Rep* 9, 836, DOI:10.1038/s41598-018-37332-w (<https://www.nature.com/articles/s41598-018-37332-w>).

[177] Amha Y.M., Anwar M.Z., Kumaraswamy R., Henschel A., Ahmad F., **2017**, Mycobacteria in Municipal Wastewater Treatment and Reuse: Microbial Diversity for Screening the Occurrence of Clinically and Environmentally Relevant Species in Arid Regions, *Environmental Science & Technology* 51 (5), p. 3048–3056, DOI: 10.1021/acs.est.6b05580 (<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.est.6b05580>).

[178] Strona internetowa: www.velpol.org.pl; Występowanie prątków z kompleksu *Mycobacterium tuberculosis* u zwierząt – transmisja wybranych gatunków między ludźmi a zwierzętami (dostęp na dzień: 20.12.2023r.).

[179] Seshadhri S.P., Thangavelu T., Thangavel S.M., **2015**, Genetic diversity among yersinia enterocolitica isolated from sewage, raw milk and packed foods, *JMBFS*, DOI: 10.15414/jmbfs.2014-15.4.3.271-276.

[180] Percival S.L., Williams D.W., **2014**, Chapter Thirteen - Yersinia, Editor(s): Steven L. Percival, Marylynn V. Yates, David W. Williams, Rachel M. Chalmers, Nicholas F. Gray, *Microbiology of Waterborne Diseases* (Second Edition), Academic Press, p. 249–259, ISBN 9780124158467, DOI:10.1016/B978-0-12-415846-7.00013-5. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124158467000135>).

[181] Njoya A.M., Eheth J.S., Poutoum Y., Metsopkeng C.S., Moldovan C.V., et al., **2022**, Proteus bacteria species from hospital sewage and Mfoundi River in Yaounde (Cameroon, Central Africa): Comparison of the diversity, abundance and susceptibility against some β -lactams, Quinolones and Aminoglycosides antibiotics, *Journal of Advances in Microbiology Research*, DOI:10.22271/micro.2022.v3.i2a.47 (<https://hal.science/hal-03825327/>).

[182] Magana-Arachchi D.N., Wanigatunge R.P., **2020**, Chapter 2 - Ubiquitous waterborne pathogens, Editor(s): Majeti Narasimha Vara Prasad, Anna Grobelak, *Waterborne Pathogens*, Butterworth-Heinemann, p. 15–42, ISBN 9780128187838, DOI:10.1016/B978-0-12-818783-8.00002-5. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128187838000025>)

[183] Alonso E., Santos A., Riesco P., **2004**, Micro-organism re-growth in wastewater disinfected by UV radiation and ozone: a micro-biological study, *Environ Technol.*, 25(4), p.433–441, DOI:10.1080/09593332508618452. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15214448/>).

[184] Bitton G., **2005**, Microbial indicator of faecal contamination: Application to microbial source tracking. Report submitted to the Florida Storm water Association, Association 719 East Park Avenue, Tallahassee, 32301. University of Florida.

-
- [185] Vierheilig J., Frick C., Mayer R.E., Kirschner A.K.T., Reischer G.H., Derx J., Mach R.L., Sommer R., Farnleitner A.H., **201**, niepełna data *Clostridium perfringens* is not suitable for the indication of faecal pollution from ruminant wildlife but is associated with excreta from nonherbivorous animals and human sewage, *Appl Environ Microbiol* 79(16), p. 5089–5092.
- [186] Bobrowski M.M., **2002**, Podstawy biologii sanitarnej, *Wydawnictwo Ekonomia i Środowisko*, Białystok.
- [187] Egli T., **2008**, New methods for assessing the safety of drinking water, *Eawag news*, Nr 65e, p. 20–22.
- [188] Li D., Craik S. A., Smith D.W., Belosevic M., **2009**, The assessment of particle association and UV disinfection of wastewater using indigenous spore-forming bacteria, *Water Research*, Vol. 43, Issue 2, p. 481–489, ISSN 0043-1354, DOI:10.1016/j.watres.2008.10.025, (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135408004892>).
- [189] Kosicka-Dziechciarek D., Wolna-Maruwka A., Mazurkiewicz J., **2015**, The Danger of Pathogenic Organisms in Sewage Sludge and Methods of Their Reduction, *Archives of Waste Management and Environmental Protection*, ISSN 1733-4381, Vol. 17, Issue 4, p. 127–138 (<https://yadda.icm.edu.pl/baztech/element/bwmeta1.element.baztech-f4865d2d-6aeb-43bb-923b-1eff2a900914>).
- [190] Gromiec M., Sadurski A., Zalewski M., Rowiński P. **2014**, Zagrożenia związane z jakością wody. *Nauka* (1).
- [191] Sudlitz M., **2020**, Hygienization of sewage sludge using ionizing radiation. Examples of installations for radiation processing of sewage sludges, *PTJ*, Vol. 63. Issue. 2, p. 35–40, (<http://www.ichtj.waw.pl/ichtj/publ/REPOZYTORIUM/2020/artykuly/ptj2020no2p35.pdf>).
- [192] Kiziewicz B., Czeczuga B., **2001**, Aspekty ekologiczne występowania *Trichosporon Cutaneum* (de beurman gougerot et vaucher, 1909 ota, 1915) w wodach północno-wschodniej Polski, *Wiadomości Parazytologiczne*, t. 47(4), p. 783–788.
- [193] Kiziewicz B., **2004**, ,grzyby wodne występujące w stawach i rzekach, Baza Agro
- [194] Kiziewicz B., **2004**, Grzyby wodne występujące w zbiorniku wodnym w Zarzeczanach w Wojewodztwie Podlaskim, *Wiadomości Parazytologiczne*, t. 50(3), p. 587–593.
- [195] Raota C.S., Cerbaro A.F., Salvador M., Longaray Delamare A.P., Echeverrigaray S., Selva Crespo J., Barcellos da Silva T., Giovanela M., **2019**, Green synthesis of silver nanoparticles using an extract of Ives cultivar (*Vitis labrusca*) pomace: Characterization and application in wastewater disinfection, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Vol. 7, Issue 5, 103383, DOI:10.1016/j.jece.2019.103383.
- [196] Kosmala K., Szymańska R., **2016**, Nanocząstki tlenku tytanu (IV). Otrzymywanie, właściwości i zastosowanie, *Kosmos Problemy Nauk biologicznych*, tom 65 nr 2 (311), p. 235–245, (<http://kosmos.icm.edu.pl/PDF/2016/235.pdf>)
- [197] Toader G., Chiurciu V., Mrierean N., Sevciuc P., Filip V., Burnichi F., Trifan D., Luxita R., Catalin Ionut E., Toader V., Ilie L., **2020**, Economic advantages of using bacterial biopreparations in agricultural crops, *Agrarian Economy and Rural Development – Realities and Perspectives for Romania* 11, p. 230–237.
- [198] Kuźniar A., Włodarczyk K., Siara A., Wolińska A., **2021**, Aktualny stan wiedzy na temat biopreparatów stosowanych w rolnictwie, Lublin, ISBN 978-83-8061-964-7,

(<https://repozytorium.kul.pl/server/api/core/bitstreams/08f7c77d-532a-4a36-8fb6-3259c87bea69/content>).

[199] Dymaczewski Z., Komorowska-Kaufman M., Krajewski P., **2016**, Wpływ stosowania kompleksów enzymatyczno-bakteryjnych w sieci kanalizacyjnej na jakość ścieków dopływających do oczyszczalni, *Water Put Poznan, Zaopatrzenie w wodę, jakość i ochrona wód*, p. 939–953, (https://water.put.poznan.pl/images/fullpapers2016/TECHNOLOGIE_OCZYSZCZANIA_SCIEKOW/49_WODA_2016_WODA_5_10062016.pdf).

[200] Malucha P., **2012**, Zastosowanie biopreparatów w procesie oczyszczania wód i ścieków, *Energopomiar Sp. z o.o., Lublin* p. 1–2.

[201] Grzyb A., Warczewska Z., Niewiadomska A., Wolna-Maruwka A., **2019**, Czym są biopreparaty i jakie jest ich zastosowanie?, *Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu*, t. 13, z. 2, p. 65–76, Poznań ISSN 1897-7820.

[202] Higa T., Chinen N., **1998**, EM treatments of odor, waste water, and environment problems, *College of Agriculture, Okinawa, Japan, University of Ryukyus*.

[203] Strona internetowa: <https://agromen.pl/srodki-czystosci/1720-greenland-em-bio-11-5907738935541.html> (data dostępu: 10.10.2023).

[204] Jurkowski A., Kierpiec M., Koziół J.J., **2018**, Wpływ dyspersji nanocząstek Fe₃O₄ na wybrane parametry hodowli *L. plantarum* 299v, *Przegląd prac z zakresu mikrobiologii, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin*, p. 53.

[205] Zakaria Z., Gairola S., Sharif N.M., **2010**, Effective Microorganisms (EM) Technology for Water Quality Restoration and Potential for Sustainable Water Resources and Management, *Biology Programme, School of Distance Education, 11800 Universiti Sains Malaysia, Penang, MALAYSIA*.

[206] Elshafai, Maha & Elmoteleb, Enas, **2017**, Investigate the effect of effective microorganism (EM) on improving the quality of sewage water from al-gabal al-asfar area in Egypt, Conference: The 1st. International Conference on towards a better quality of lifeat: El Gouna, Red Sea Region – EGYPT.

[207] Sip A., Krasowska M., Więckowicz M., Grajek W., **2009**, Metody skryningu bakteriocynogennych bakterii fermentacji mlekowej, *Żywność, Naukowa. Technologia. Jakość* 1, (52), p. 5–26.

[208] Namsivayam, S.K.R., Narendrakumar, G., and Kumar, J.A., **2011**, Evaluation of Effective Microorganism (EM) for treatment of domestic sewage, *Journal of Experimental Sciences* 2.

[209] Sip A., **1999**, Produkcja bakteriocyn przez bakterie mlekowe, *Biotechnologia* 2(45), p. 145–166, (https://rcin.org.pl/Content/142815/PDF/POZN271_178146_biotechnologia-1999-no2-sip.pdf).

[210] Montville T. J., Kaiser A. L., **1993**, Bacteriocins of lactic acid bacteria, Eds. Hoover D. H., Steenson L. R., 3-19, *Academic Press Inc, New York*.

[211] Strona internetowa: <https://images.elk.pl/221/4/> (dostęp na dzień: 19.01.2024r.).

[212] Rudolfs W., **1932**, Enzymes and Sludge Digestion, *Sew. Works* 4(782)/1932.

[213] Hankelekian H., **1959**, Chemical Composition of the Particulate Fractions of Domestic Sewage, *Sew. and Industrial Wastes* 31/1959.

[214] Mc.Kinney R.E., **1953**, Biocatalystes and waste disposal, effect on activated sludge, *Sew. and Industrial Wastes* 25/1953.

-
- [215] Krajewski P., **2006**, Biopreparaty – historia, rozwój i aplikacje, *Czasopismo Wodociągi – Kanalizacja*, nr 1, p. 24–27.
- [216] Robinson, R.R., **1954**, Enzymes give good results in sewage treatment plant, *Public Works*, 85, p. 116.
- [217] Bryan, A.C., **1969**, How enzymes improve sludge digestion, *Public Works*, 83.
- [218] Chambers, J.V., **1977**, Bioengineering and activated microflora to improve waste removal performance. *5th Annual Industrial Pollution Conference*, Atlanta, Georgia, USA.
- [219] Yung, J., **1987**, A screening test to determine the effectiveness of biocatalytic additives. *Iowa State Engineering Research Institute Report No 7*.
- [220] Aitken, M.D., **1993**, Waste treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles, *The Chemical Engineering Journal*, 52, p. 49–58.
- [221] Kolasa-Wiącek A., **2010**, Czy efektywne mikroorganizmy zrewolucjonizują świat? *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego* 2010/1, p. 66–69.
- [222] Mau F.P., **2007**, Niezwykłe rezultaty w stosowaniu EM w domu i ogrodzie dla lepszego wzrostu roślin i zdrowia, *Wydawnictwo Fundacji Źródła Życia*, Monachium, ISBN 978-83-87895-69-3.
- [223] Sosnowska D., **2019**, Parasitic and antagonistic fungi in biological plant protection in Poland, *Progress in Plant Protection* 59(4), p. 223–231.
- [224] Guo D.-J., Singh R.K., Singh P., Li D.-P., Sharma A., Xing Y.-X., Song X.-P., Yang L.-T., Li Y.-R., **2020**, Complete Genome Sequence of *Enterobacter roggkampii* ED5, a Nitrogen Fixing Plant Growth Promoting Endophytic Bacterium With Biocontrol and Stress Tolerance Properties, *Isolated From Sugarcane Root. Frontiers in Microbiology* 11, 580081.
- [225] Paśmionka I., Kotarba K., **2015**, Możliwości wykorzystania efektywnych mikroorganizmów w ochronie środowiska, *KOSMOS Problemy Nauk Biologicznych*, Tom 64, nr 1 (306), p. 173-184
- [226] Mazur Z., **2021**, Biologiczne metody rekultywacji wód powierzchniowych, praca magisterska Politechnika Rzeszowska.
- [227] Stefaniak P., **2004**, Czym pachnie biotechnologia w Polsce?, (<https://biotechnologia.pl/biotechnologia/czym-pachnie-biotechnologia-w-polsce,12179>).
- [228] Kazanowska J., Szaciło J., **2012**, Analiza jakości osadów ściekowych oraz możliwość ich przyrodniczego wykorzystania, *Acta Agrophysica*, 19(2), p. 343353.
- [229] Parys S., **2001**, Dezynfekcja wody pitnej za pomocą promieniowania UV. *Materiały budowlane* 5, p. 88–92.
- [230] Basu S., Page J., Wei I.W., **2007**, UV disinfection of treated wastewater effluent: influence of color, reactivation and regrowth of coliform bacteria, *Environmental Engineer, Applied Research and Practice*, Vol. 4
- [231] Kunicki-Goldfinger W., **1971**. Życie bakterii. *Wydawnictwo Naukowe PWN*, Warszawa.
- [232] Olańczuk-Neyman K., Bray R., Fudala-Książek S., Jankowska K., Kulbat E., Łuczkiwicz A., Quant B., Sokołowska A., **2012**, Wybrane, mikrobiologiczne aspekty dezynfekcji ścieków oczyszczonych, Seidel-Przywecki, *Forum Eksploatatora*, nr 1, (<https://seidel-przywecki.eu/2020/04/15/wybrane-mikrobiologiczne-aspekty-dezynfekcji-sciekow-oczyszczonych>).

-
- [233] Umar M., **2022**, From Conventional Disinfection to Antibiotic Resistance Control—Status of the Use of Chlorine and UV Irradiation during Wastewater Treatment, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(3):1636, DOI:10.3390/ijerph19031636 (<https://www.mdpi.com/1660-4601/19/3/1636>).
- [234] Kudlek E., Dudziak M., **2017**, Rola promieniowania UV w oczyszczeniu wody i ścieków, *Inżynieria Środowiska - młodym okiem*, t. 31, Ścieki i osady ściekowe, p. 54–74,
- [235] Gromiec M., Gromiec T., **2013**, Dezynfekcja wody i ścieków za pomocą promieniowania UV, *Wodociągi i Kanalizacja*, 7–8, p. 44 – 47.
- [236] Solecka M., **2011**, Zastosowanie promieniowania ultrafioletowego do dezynfekcji ścieków miejskich, *Ekologia i Technika* 9(3), p. 115–121.
- [237] Santos A.B.K., Claro E.M.T., Montagnolli R.N., Cruz J.M., Lopes P.R.M., Bidoia E.D., **2017**, Electrochemically assisted photocatalysis: Highly efficient treatment using thermal titanium oxides doped and non-doped electrodes for water disinfection. *J. Environ. Manag.* 204, p. 255–263.
- [238] Zamajski R., **2007**, Ultrafiolet, Nowoczesna metoda dezynfekcji wody i ścieków, *Technologia wody* (<https://technologia-wody.pl/posts/2007-07-22-ultrafiolet-nowoczesna-metoda-dezynfekcji-wody-i-sciekow>)
- [239] Uslu G., Demirci A., Regan J.M., **2015**, Efficacy of pulsed UV-light treatment on wastewater effluent disinfection and suspended solid reduction. *J. Environ. Eng.* 141, p. 1–10.
- [240] Słoboda M., Włodyka-Bergier A., **2015**, Analiza możliwości zastosowania zaawansowanych metod utleniania do dezynfekcji ścieków komunalnych, *Logistyka* 4(CD3), p. 9773–9779.
- [241] Cairns, W. L., **1993**, Comparing Disinfection by Ultraviolet Light and Chlorination - The Implications and Mechanism for Practice, *Proceedings of the WEF Planning Design and Operation: Effluent Disinfection Systems Specialty Conference*, Whoppany, NJ.
- [242] Gonzalez Y., Gomez G., Moeller-Chavez G.E, Vidal G., **2023**, UV Disinfection Systems for Wastewater Treatment: Emphasis on Reactivation of Microorganisms, *Sustainability* 15(14), 11262; DOI:10.3390/su151411262 (<https://www.mdpi.com/2071-1050/15/14/11262>)
- [243] Hancock G.G., Davis E.M., **1999**, Regrowth Potential of Coliforms after UV Disinfection of Municipal Wastewater, *J. Environ. Sci. Health*, A34 (9), p. 1737–1743.
- [244] Jagodziński J., Dziągow S., Krzywonos M., **2016**, Stabilność mikrobiologiczna domowych piw niepasteryzowanych, *Acta Scientiarum Polonorum: Biotechnologia*, Vol 15, Issue 3, p.15
- [245] Strona internetowa: https://www.e3s-conferences.org/articles/e3sconf/abs/2018/19/e3sconf_eko-dok2018_00199/e3sconf_eko-dok2018_00199.html. (dostęp na dzień: 22.05.2023r.)
- [246] Toklucu A.K., Pala C.U., **2013**, Microbial, physicochemical and sensory properties of UV-C processed orange juice and its microbial stability during refrigerated storage, *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 50, Issue 2, p. 426-431, DOI: 10.1016/j.lwt.2012.09.001
- [247] Sokołowska A., Jankowska K., Kulbat E., Oleńczuk-Neyman K., **2015**, Badania stabilności biologicznej wody w wybranych systemach wodociągowych, *Ochrona Środowiska*, Vol. 37, nr 4, p. 31-37
- [248] Cantwell R.E., Hofmann R., **2011**, Ultraviolet absorption properties of suspended particulate matter in untreated surface waters, *Water Res.* 45, p.1322–1328.

-
- [249] Collivignarelli M.C., Abbà A., Miino M.C., Caccamo F.M., Torretta V., Rada E.C., Sorlini S., **2021**, Disinfection of Wastewater by UV-Based Treatment for Reuse in a Circular Economy Perspective. Where Are We at? *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(1): 77, (<https://doi.org/10.3390/ijerph18010077><https://www.mdpi.com/1660-4601/18/1/77>).
- [250] Emerick R.W., Loge F.J., Ginn T., Darby J.L., **2000**, Modeling the inactivation of particle-associated coliform bacteria. *Water Environment Research*, brak numeru I stron.
- [251] Vasilyak L.M., **2010**, Ultrasound application in systems for the disinfection of water, *Surf. Eng. Appl. Electrochem* 46, p. 489–493.
- [252] Augsburger N., Rachmadi A.T., Zaouri N., Lee Y., Hong P.Y., **2021**, Recent Update on UV Disinfection to Fulfill the Disinfection Credit Value for Enteric Viruses in Water, *Environmental Science & Technology* 55 (24), p. 16283–16298, DOI:10.1021/acs.est.1c03092 (<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.est.1c03092>).
- [253] Konieczny K., Ćwikła J., **2014**, Zastosowanie wody z odnowy po mikrofiltracyjnym oczyszczaniu, *Zaopatrzenie W Wodę, Jakość i Ochrona Wód, Water Put Poznan*, (https://water.put.poznan.pl/images/fullpapers/2014/ODNOWA_WOD/641_WODA2014_WODA_2014.pdf).
- [254] Li Z., Liu X., Huang Z., Hu S., Wang J., Qian Z., Feng J., Xian Q., Gong T., **2019**, Occurrence and ecological risk assessment of disinfection byproducts from chlorination of wastewater effluents in East China, *Water Research*, Vol. 157, 15, p. 247–257, DOI:/10.1016/j.watres.2019.03.072.
- [255] Manoli K., Maffettone M., Sharma V.K., Santoro D., Ray A.K., Passalacqua K.D., Carnahan K.E., C.E. Wobus, Sarathy S., **2020**, Inactivation of Murine Norovirus and Fecal Coliforms by Ferrate(VI) in Secondary Effluent Wastewater, *Environ. Sci. Technol.* 54, 3, p.1878–1888, DOI: 10.1021/acs.est.9b05489.
- [256] Kaushar H., Khan N.A., Vambol V., Vambol S., Yeremenko S., Sydorenko V., **2022**, Advancement in Ozone base wastewater treatment technologies: Brief review, *Ecological Questions* 33, 2, p. 7–19, DOI:10.12775/EQ.2022.10 (<https://apcz.umk.pl/EQ/article/view/37395/31628>).
- [257] Cao Y., Qiu W., Li J., Jiang J., Pang S., **2021**, Review on UV/sulfite process for water and wastewater treatments in the presence or absence of O₂., *Sci. Total Environ.* 765: 142762. DOI:10.1016/j.scitotenv.2020.142762.
- [258] Domingues E., Fernandes E., Gomes J. & Martins R.C., **2021**, Advanced oxidation processes perspective regarding swine wastewater treatment, *Sci. Total Environ.* 776: 145958., DOI:10.1016/j.scitotenv.2021.145958.
- [259] Lu S., Liu L., Demissie H., An G. & Wang D., **2021**, Design and application of metal-organic frameworks and derivatives as heterogeneous Fenton-like catalysts for organic wastewater treatment: A review, *Environ. Int.* 146: 106273, DOI:10.1016/j.envint.2020.106273.
- [260] Kosiniak M., **2019**, Badanie skuteczności usuwania diklofenaku ze ścieków oczyszczonych przy wykorzystaniu polskiej technologii ozonowania, *Instal* 3-2019, p. 34–39, (<https://www.ozonowanie.pl/userfiles/file/Badanie%20skuteczności%20usuwania%20diklofenaku%20ze%20ścieków%20oczyszczonych%20przy%20wykorzystaniu%20polskiej%20technologii%20ozonowania.pdf>).

-
- [261] Krosowiak K., Śmigielski K., Dziugan P., **2007**, Zastosowanie ozonu w przemyśle spożywczym, *Technika w Przemysle Spozywczym*, 11, p. 26–29, (<https://www.ozonowanie.com/wp-content/uploads/2018/03/zastosowanie-ozonu-w-przemysle-spozywczym.pdf>).
- [262] Rekhate C.V., Srivastava J.K., **2020**, Recent advances in ozone-based advanced oxidation processes for treatment of wastewater- A review, *Chem. Eng. J. Adv.* 3: 100031, DOI:10.1016/j.ceja.2020.100031.
- [263] Tripathi S., Hussain T., **2022**, Water and Wastewater Treatment through Ozone-based technologies, Development in Wastewater Treatment Research and Processes, *Elsevier Inc.*, DOI:10.1016/b978-0-323-85583-9.00015-6.
- [264] Zoutman D., Shannon M., Mandel A., **2011**, Effectiveness of a novel ozone-based system for the rapid high-level disinfection of health care spaces and surfaces, *American Journal of Infection Control*, Vol. 39, Issue 10, p. 873–879, ISSN 0196-6553, DOI:10.1016/j.ajic.2011.01.012. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019665531100160X>).
- [265] Bielicka-Gieldoń A., Grabowska E., Siedlecka E.M., Zaleska A., **2014**, Inżynieria Środowiska, Projekt „Kształcenie kadr dla innowacyjnej gospodarki opartej na wiedzy w zakresie agrochemii, chemii i ochrony środowiska (Inno-AgroChemOŚ)”, *Uniwersytet Gdański*, (https://chemia.ug.edu.pl/sites/default/files/_nodes/strona-chemia/14333/files/okladka_skrypt2014_inzynieria_srodowiska.pdf).
- [266] Natonek J., **2022**, Wykorzystanie ozonu w dezynfekcji i podnoszeniu bezpieczeństwa eksploatacji sieci wodociągowej, rozprawa doktorska, Politechnika Śląska, (https://repolis.bg.polsl.pl/Content/74888/Natonek_Jozef_PhD_2022.pdf).
- [267] Fu L., Wu Ch., Zhou Y., Zuo J., Song G., Tan Y., **2019**, Ozonation reactivity characteristics of dissolved organic matter in secondary petrochemical wastewater by single ozone, ozone/H₂O₂, and ozone/catalyst, *Chemosphere*, Vol. 233, p. 34–43, ISSN 0045-6535, DOI:10.1016/j.chemosphere.2019.05.207, (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653519311282>).
- [268] Katsoyiannis I.A., Canonica S., von Gunten U., **2011**, Efficiency and energy requirements for the transformation of organic micropollutants by ozone, O₃/H₂O₂ and UV/H₂O₂, *Water Research*, Vol. 45, Issue 13, p. 3811–3822, ISSN 0043-1354, DOI:10.1016/j.watres.2011.04.038, (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135411002272>).
- [269] Ramseier M.K., Gunten U., Freihofer P., Hammes F., **2011**, Kinetics of membrane damage to high (HNA) and low (LNA) nucleic acid bacterial clusters in drinking water by ozone, chlorine, chlorine dioxide, monochloramine, ferrate(VI), and permanganate, *Water Research* 45, p. 1490-1500.
- [270] Epelle, E.I.; Macfarlane, A.; Cusack, M.; Burns, A.; Amaeze, N.; Richardson, K.; Mackay, W. Rateb, M.E.; Yaseen, M., **2022**, Stabilisation of Ozone in Water for Microbial Disinfection. *Environments*, Vol. 9, Issue 45, DOI:10.3390/environments9040045
- [271] Dudziak M., Burdzik E., Kudlek-Jelonek E., **2014**, Wstępne badania nad usuwaniem bisfenolu a w procesach UV, O₃ i UV-O₃ (<http://www.eko-dok.pl/2014/20.pdf>).
- [272] Ning B., Graham N.J.D., Zhang Y., **2007**, Degradation of octylphenol and nonylphenol by ozone – Part II: Indirect reaction, *Chemosphere*, Vol. 68, Issue 6, p. 1173–1179, ISSN 0045-6535, DOI:10.1016/j.chemosphere.2007.01.056, (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653507001518>).

-
- [273] Affek K.A, **2021**, Niekorzystne działanie produktów ubocznych powstających podczas dezynfekcji ścieków, praca inżynierska, Politechnika Warszawska, Warszawa, (<https://repo.pw.edu.pl/info/bachelor/WUT50fabca10545474b957a65e7d0d10083/>).
- [274] Zbieć E., Dojlido J.R., **1999**, Uboczne produkty dezynfekcji, *Ochrona Środowiska* 3(74), (http://www.os.not.pl/docs/czasopismo/1999/Zbiec_3-1999.pdf). Brak numerów stron
- [275] Dymaczewski Z., Jeż-Walkowiak J., Michałkiewicz M., Sozański M.M., Znaczenie procesu dezynfekcji w zapewnieniu bezpieczeństwa mikrobiologicznego wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi, *Ochrona Środowiska*, Vol. 41, nr 1, p. 3–9, (<https://yadda.icm.edu.pl/baztech/element/bwmeta1.element.baztech-bbb1d8ae-1437-40f5-be72-358a238d3cf2>).
- [276] Główny Inspektorat Sanitarny, **2018**, Ogólna liczba mikroorganizmów w 22°C w wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi./ Znaczenie i zagrożenia dla bezpieczeństwa zdrowotnego. Postępowanie w przypadku podwyższonych wartości stężeń, Warszawa.
- [277] Kręgiel D., **2011**, Zastosowanie luminometrii w badaniach adhezji drobnoustrojów do powierzchni abiotycznych, *Techniki i Metody*, Lab rok 16, nr 4, p. 10–14 (<https://labportal.pl/zastosowanie-luminometrii-w-badaniach-adhezji-drobnoustrojow-do-powierzchni-abiotycznych>).
- [278] Chancy A., Santschi D.E., Paquet E.R., Renaud D.E., Gauthier M.L., Charbonneau E., Barbeau-Grégoire N., Van Driessche L, Buczinski S., **2023**, Standardization and validation of ATP luminometry as a diagnostic tool to assess the cleanliness of feeding equipment in preweaning calves, *Journal of Dairy Science*, Vol. 106, Issue 9, p. 6263–6274, ISSN 0022-0302, DOI:10.3168/jds.2023-23227, (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030223004265>).
- [279] Rygala A., Kręgiel D., **2016**, Luminometria w przemyśle spożywczym, *Kierunek Spożywczy*, (<https://www.kierunek68pozywczy.pl/magazyn,luminometria-w-przemysle-spozywczym.html>).
- [280] Zerek B.F., Piechal J., **2019**, Zastosowanie testów luminometrycznych (ATP/AMP) w badaniach mikrobiologicznych obiektów w Bibliotece Narodowej, *Notes Konserwatorski* 21, DOI:10.36155/NK.21.00002, (https://notes.bn.org.pl/upload/pdf/28439_02_Notes_21%20Zerek_Luminometria_49%E2%80%93378.pdf).
- [281] Bartoszcze M., Bielawska-Drozd A., **2007**, Bioluminometria - szybka metoda wykrywania zanieczyszczeń biologicznych, *Żywność Człowieka i Metabolizm* 34, 1–2, p. 530–537 (<https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.agro-article-da40fd66-d9aa-4698-a188-6c6d36ca66c5>).
- [282] Stanley P.E., **1989**, A review of bioluminescent ATP techniques in rapid microbiology, *Bioluminescence and Chemiluminescence Applications*, *Rapid Microbiology*, Vol. 4, Issue 1, p. 375–380, DOI:10.1002/bio.1170040151.
- [283] Linklater N., Ormeci B., **2014**, Evaluation of the adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence assay for monitoring effluent quality and disinfection performance, *Water Quality Research Journal* 49 (2), p. 114–123. (<https://iwaponline.com/wqrj/article/49/2/114/21566/Evaluation-of-the-adenosine-triphosphate-ATP>).
- [284] Roudriguez A.B., Duranceau S.J., **2020**, Evaluating adenosine triphosphate bioluminescence for biomonitoring in potable water systems, *Journal of Water Supply: Research and Technology-Aqua* 69 (7), p. 668–677, DOI: 10.2166/aqua.2020.016 (<https://iwaponline.com/aqua/article-abstract/69/7/668/77474/Evaluating-adenosine-triphosphate-bioluminescence>).

-
- [285] Xie, Xuesong, **2014**, Development of a rapid atp analysis method: biomass growth atp method for uv disinfection monitoring in wastewater treatment, Dalhousie University, (<https://dalspace.library.dal.ca/handle/10222/55994>).
- [286] Jansson R., **2022**, Application potential of an on-line ATP analyzer for process control, Abo Akademi University (<https://www.doria.fi/handle/10024/185113>).
- [287] Zamorska J., Karwowska E., Przytaś W., **2023**, Assessment of Microbiological Quality of Water Using Culture Methods, Flow Cytometry and Luminometry, *Water* 15(23), 4077, DOI:10.3390/w15234077 (https://www.mdpi.com/2073-4441/15/23/4077?utm_campaign=releaseissue_waterutm_medium=emailutm_source=releaseissueutm_term=doilink88).
- [288] Dalzell D.J.B., Christofi N., **2002**, An ATP luminescence method for direct toxicity assessment of pollutants impacting on the activated sewage sludge process, *Water Research*, Vol. 36, Issue 6, p. 1493–1502, ISSN 0043-1354, DOI:10.1016/S0043-1354(01)00346-3. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135401003463>).
- [289] Arretxe M., Heap J.M., Christofi N., **1998**, The effect of toxic discharges on ATP content in activated sludge, *Environmental Toxicology and Water Quality*, Vol. 12, Issue 1, p. 23–29, ([https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1098-2256\(1997\)12:1%3C23::AID-TOX4%3E3.0.CO;2-A](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1098-2256(1997)12:1%3C23::AID-TOX4%3E3.0.CO;2-A)
- [290] Óluva K. Vang, Charlotte B. Corfitzen, Christian Smith, Hans-Jørgen Albrechtsen, **2014**, Evaluation of ATP measurements to detect microbial ingress by wastewater and surface water in drinking water, *Water Research*, Vol. 64, p 309-320, ISSN 0043-1354, DOI:10.1016/j.watres.2014.07.015.
- [291] Fulwyler M.J., **1965**, Electronic separation of biological cells by volume, *Science* 150, p. 910–911.
- [292] Moldavan A., **1934**, Photo-electric technique for the counting of microscopical cells. *Science* 80, p. 188–189.
- [293] Gucker F.T. Jr, O'Konski C.T., **1949**, Electronic methods of counting aerosol particles, *Chem. Rev.* 44, 373.
- [294] Crosland-Taylor P.J., **1953**, A device for counting small particles suspended in fluid through a tube. *Nature* 171(4340), p. 37–38.
- [295] Coulter W.H., **1956**, High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer, *Proc. NEC* 12, p. 1034–1042.
- [296] Kamentsky L.A., Melamed M.R., Derman H., **1965**, Spectrophotometer: new instrument for ultrarapid cell analysis, *Science* 150, p. 630–631.
- [297] Kamentsky L.A., Derman H., Melamed M.R., **1963**, Ultraviolet absorption in epidermoid cancer cells, *Science* 142, p. 1580–1583.
- [298] Robinson J.P., **2022**, Flow cytometry: past and future, *BIOTECHNIQUES*, Vol. 72, No. 4 Review, DOI:10.2144/btn-2022-0005 (<https://www.future-science.com/doi/full/10.2144/btn-2022-0005>).
- [299] Coons A.H., Creech H.J., Jones R.N., **1941**, Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 47, p. 200–202.

-
- [300] Coons A.H., Kaplan M.H., **1950**, Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody, *J. Exp. Med.* 91, p. 1–13
- [301] Hulett H.R., Bonner W.A., Barrett J., Herzenberg L.A., **1969**, Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence, *Science* 166(3906), p. 747–749.
- [302] Wang Y., Hammes F., De Roy K., Verstraete W. i Boon N., **2010**, Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology, *Trends Biotechnol* 28(8), p. 416–424.
- [303] Grywalska E., Roliński J., **2012**, Cytometria przepływowa, *Wielka Interna. Hematologia*. (<https://podyplomie.pl/wiedza/wielka-interna/735,cytometria-przeplywowa>).
- [304] Hammes F., Egli T., **2010**, Cytometric methods for measuring bacteria in water: advantages, pitfalls and applications, *Anal Bioanal Chem* 397, p. 1083–1095, DOI: 10.1007/s00216-010 3646-3.
- [305] Kiełb-Sotkiewicz I., **2021**, Zastosowanie cytometrii przepływowej w badaniach prób środowiskowych, II Międzynarodowa Konferencja Strategie Wdrażania Zielonego Ładu – Woda, Surowce i Energia, Monografia cz. II, p. 61–74.
- [306] Adomat Y., Orzechowski G.H., Pelger M., Haas R., Bortak R., Nagy-Kovacs Z.A., Appels J., Grischek T., **2020**, New Methods for Microbiological Monitoring at Riverbank Filtration Sites, *MDPI Water* 12, 584, DOI:10.3390/w12020584.
- [307] Skotny A., Pucińska J., **2013**, Współczesna cytometria przepływowa. *Acta Bio-Optica et Informatica Medica Inżynieria Biomedyczna* 19(1).
- [308] Shapiro H.M., **2003**, Practical Flow Cytometry, *Wiley-Liss publication*, 4 edition.
- [309] Safford H.R., Bischel H.N., **2019**, Flow cytometry applications in water treatment, distribution, and reuse: A review, *Water Research* 151, p. 110–133.
- [310] Berney M., Vital M., Hulshoff I., Weilenmann H.U., Egli T. i Hammes F., **2008**, Rapid, cultivation-independent assessment of microbial viability in drinking water, *Water Res.* 42, p. 4010–4018.
- [311] Sarron E., Aussenac T., Cochet N. Gadonna-Widehem P., **2012**, Effect of ozone treatment on microorganisms viability evaluated by flow cytometry and plate count technique. (https://www.researchgate.net/publication/336891052_Effect_of_ozone_treatment_on_microorganisms_viability_evaluated_by_flow_cytometry_and_plate_count_technique).
- [312] Hammes F., Berney M., Wang Y., Vital M., Koster O. i Egli T., **2008**, Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes, *Water Res.* 42, p. 69–277.
- [313] Koch C., Harnisch F., Schröder U. i Müller S., **2014**, Cytometric fingerprints: evaluation of new tools for analyzing microbial community dynamics, *Front Microbiol* 5, p. 1–12.
- [314] Forster S., Lappin-Scott H.M., Snape J.R. i Porter J., **2003**, Rains, drains and active strains: towards online assessment of wastewater bacterial communities, *Journal of Microbiological Methods* 55(3), p. 859–864, DOI:10.1016/j.mimet.2003.08.004.
- [315] Ma, L., Mao, G., Liu, J., Yu, H., Gao, G., Wang, Y., **2013**, Rapid quantification of bacteria and viruses in influent, settled water, activated sludge and effluent from a wastewater treatment plant using flow cytometry, *Water Sci. Technol.* 68, p. 1763–1769, DOI:10.2166/wst.2013.426.
- [316] Brown, M.R., Camézuli, S., Davenport, R.J., Petelenz-Kurdziel, E., Øvreås, L., Curtis, T.P., **2015**, Flow cytometric quantification of viruses in activated sludge, *Water Res.* 68, p. 414–422.

-
- [317] Widmer G., Clancy T., Ward H.D., Miller D., Batzer G.M., Pearson Ch.B., Bukhari Z., **2002**, Structural and biochemical alterations in giardia lamblia cysts exposed to ozone, *J Parasitol* 88 (6), p. 1100–1106. DOI: 10.1645/0022-3395(2002)088[1100:SABAIG]2.0.CO;2 (<https://meridian.allenpress.com/journal-of-parasitology/article-abstract/88/6/1100/3187/STRUCTURAL-AND-BIOCHEMICAL-ALTERATIONS-IN-GIARDIA>).
- [318] Howard K., Inglis T.J.J., **2003**, The effect of free chlorine on Burkholderia pseudomallei in potable water, *Water Research*, Vol. 37, Issue 18, p. 4425–4432, ISSN 0043-1354, DOI:10.1016/S0043-1354(03)00440-8. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135403004408>).
- [319] Bosshard F., Berney M., Scheifele M., Weilenmann H.U., Egli T., **2009**, Solar disinfection (SODIS) and subsequent dark storage of Salmonella typhimurium and Shigella flexneri monitored by flow cytometry, *Microbiology Society*, Vol. 155, Issue 4 DOI: 10.1099/mic.0.024794-0 (<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.024794-0>).
- [320] Ssemakalu C.C., Pillay M., Barros E., **2012**, The effect of solar ultraviolet radiation and ambient temperature on the culturability of toxigenic and nontoxigenic Vibrio cholerae in Pretoria, South Africa, *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 6(30), p. 5957–5964, DOI: 10.5897/AJMR12.601 (<https://academicjournals.org/journal/AJMR/article-full-text-pdf/4D192FF23098.pdf>).
- [321] Helmi L., Barthod F., Méheut G., Henry A., Poty F., Laurent F., Charni-Ben-Tabassi N., **2015**, Methods for microbiological quality assessment in drinking water: a comparative study, *J Water Health* 13 (1), p. 34–41, DOI:10.2166/wh.2014.056 (<https://iwaponline.com/jwh/article/13/1/34/28217/Methods-for-microbiological-quality-assessment-in>).
- [322] Daly R.I., Ho L., Brookes J.D., **2007**, Effect of Chlorination on Microcystis aeruginosa Cell Integrity and Subsequent Microcystin Release and Degradation, *Environmental Science & Technology* 41 (12), p. 4447–4453, DOI: 10.1021/es070318s (<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es070318s>).
- [323] Fan J., Rao L., Chiu Y.T., Lin T.F., **2016**, Impact of chlorine on the cell integrity and toxin release and degradation of colonial Microcystis, *Water Research*, Vol. 102, p. 394–404, ISSN 0043-1354, DOI:10.1016/j.watres.2016.06.053. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135416304912>).
- [324] Nie, X., Liu, W., Chen, M. et al., **2016**, Flow cytometric assessment of the effects of chlorine, chloramine, and UV on bacteria by using nucleic acid stains and 5-cyano-2,3-ditolyltetrazolium chloride, *Front. Environ. Sci. Eng.* 10, 12, DOI:10.1007/s11783-016-0884-4 (<https://link.springer.com/article/10.1007/s11783-016-0884-4>)
- [325] Tang G., Adu-Sarkodie K., Kim D., Kim J.H., Teefy S., Shukairy H.M, Mariñas B.J., **2005**, Modeling Cryptosporidium parvum Oocyst Inactivation and Bromate Formation in a Full-Scale Ozone Contactor *Environmental Science & Technology* 39 (23), p. 9343–9350, DOI: 10.1021/es050345n (<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es050345n>).
- [326] Heaselgrave W., Kilvington S., **2011**, The efficacy of simulated solar disinfection (SODIS) against Ascaris, Giardia, Acanthamoeba, Naegleria, Entamoeba and Cryptosporidium, *Acta Tropica*, Vol. 119, Issues 2–3, p. 138–143, ISSN 0001-706X, DOI:10.1016/j.actatropica.2011.05.004. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X11001446>).
- [327] Bricheux G., Le Moal G., Hennequin C., Coffe G., Donnadiou F., Portelli Ch., Bohatier J., Forestier Ch., **2013**, Characterization and evolution of natural aquatic biofilm communities exposed in vitro to herbicides, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 88, p. 126–134, ISSN 0147-6513, DOI:10.1016/j.ecoenv.2012.11.003. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014765131200406X>).

-
- [328] Yang Y., Lu Y., Wu Q.Y., Hu H.Y., Chen Y.H., Liu W.L., **2015**, Evidence of ATP assay as an appropriate alternative of MTT assay for cytotoxicity of secondary effluents from WWTPs, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 122, p. 490–496, ISSN 0147-6513, DOI:10.1016/j.ecoenv.2015.09.006. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651315300828>).
- [329] Harry I.S.K., Ameh E., Coulon F. et al., **2016**, Impact of Treated Sewage Effluent on the Microbiology of a Small Brook Using Flow Cytometry as a Diagnostic Tool, *Water Air Soil Pollut* 227, 57, DOI:10.1007/s11270-015-2723-9 (<https://link.springer.com/article/10.1007/s11270-015-2723-9>).
- [330] Vivas Z., Perujo N., Freixa A., Romani A.M., **2017**, Changes in bacterioplankton density and viability in the Tordera river, *Limnetica*, 36 (2), p. 461–475, DOI: 10.23818/limn.36.15
- [331] Kawaharasaki M., Manome A., Kanagawa T., Nakamura K., **2002**, Flow cytometric sorting and RFLP analysis of phosphate accumulating bacteria in an enhanced biological phosphorus removal system, *Water Sci Technol* 46 (1–2), p. 139–144, DOI: 10.2166/wst.2002.0469 (<https://iwaponline.com/wst/article-abstract/46/1-2/139/11598/Flow-cytometric-sorting-and-RFLP-analysis-of>).
- [332] Zilles J.L., Peccia J., Kim M.W., Hung C, Noguera D.R., **2002**, Involvement of Rhodocyclus-Related Organisms in Phosphorus Removal in Full-Scale Wastewater Treatment Plants, *Appl Environ Microbiol* 68, DOI:10.1128/AEM.68.6.2763-2769.2002 (<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aem.68.6.2763-2769.2002>)
- [333] Miyauchi R., Oki K., Aoi Y., Tsuneda S., **2007**, Diversity of Nitrite Reductase Genes in “Candidatus Accumulibacter phosphatis”-Dominated Cultures Enriched by Flow-Cytometric Sorting, *Appl Environ Microbiol* 73, DOI:10.1128/AEM.00175-07 (<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aem.00175-07>).
- [334] Mota C.R., So M.J., de los Reyes F.L., **2012**, Identification of nitrite-reducing bacteria using sequential mRNA fluorescence in situ hybridization and fluorescence-assisted cell sorting, *Microb Ecol.* 64(1), p. 256–67, DOI:10.1007/s00248-012-0018-x. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22370876/>).
- [335] Cunningham J.H., Cunningham C., Van Aken B., Lin L.-S., **2008**, Feasibility of disinfection kinetics and minimum inhibitory concentration determination on bacterial cultures using flow cytometry, *Water Sci Technol* 58 (4), p. 937–944, DOI: 10.2166/wst.2008.619 (<https://iwaponline.com/wst/article-abstract/58/4/937/14753/Feasibility-of-disinfection-kinetics-and-minimum>).
- [336] Wang M., Ateia M., Hatano Y., Miyayaga K., Yoshimura Ch., **2022**, Novel fluorescence-based method for rapid quantification of live bacteria in river water and treated wastewater, *Environ. Sci.* 1, p. 30–36 DOI: 10.1039/D1VA00017A (<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2022/va/d1va00017a>).
- [337] Kaur J., Karthikeyan R., Smith R., **2013**, Assessment of Escherichia coli reactivation after photocatalytic water disinfection using flow cytometry: comparison with a culture-based method, *Water Supply*, Vol. 13, Issue 3, p. 816–825, DOI: 10.2166/ws.2013.071 (<https://iwaponline.com/ws/article-abstract/13/3/816/27145/Assessment-of-Escherichia-coli-reactivation-after>).
- [338] Rezaeinejad S., Ivanov V., **2013**, Assessment of correlation between physiological states of Escherichia coli cells and their susceptibility to chlorine using flow cytometry, *Water Supply*, Vol. 13 Issue 4, p. 1056–1062, DOI: 10.2166/ws.2013.083 (<https://iwaponline.com/ws/article-abstract/13/4/1056/27328/Assessment-of-correlation-between-physiological>).
- [339] Nescerecka A., Juhna T., Hammes F., **2016**, Behavior and stability of adenosine triphosphate (ATP) during chlorine disinfection, *Water Research*, Vol. 101, 2016, p. 490–497, ISSN 0043-1354,

DOI:10.1016/j.watres.2016.05.087.

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135416304195>).

[340] Berney M., Weilenmann H.U., Egli T., **2006**, Flow-cytometric study of vital cellular functions in *Escherichia coli* during solar disinfection (SODIS), *Microbiology Society*, Vol. 152, Issue 6, DOI: 10.1099/mic.0.28617-0

(<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.28617-0>).

[341] Bigoni R., Köttsch S., Sorlini S., Egli T., **2014**, Solar water disinfection by a Parabolic Trough Concentrator (PTC): flow-cytometric analysis of bacterial inactivation, *Journal of Cleaner Production*, Vol. 67, p. 62–71, ISSN 0959-6526, DOI:10.1016/j.jclepro.2013.12.014. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652613008688>).

[342] Kacprzak M., Fijałkowski K., Rorat A., **2012**, Zastosowanie techniki real-time pcr w diagnostyce patogenów w procesie oczyszczania ścieków, *Acta Agrophysica*, Vol. 19, Issue 2, p 319–327, (http://www.acta-agrophysica.org/pdf-104779-35664?filename=Application%20of%20real_time.pdf).

[343] Jarczak J., Ślaska B., **2011**, Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR), *Przegląd Hodowlany*, nr 3, p. 4–8 (<http://ph.ptz.icm.edu.pl/wp-content/uploads/2016/12/2-Jarczak.pdf>).

[344] Hryniszyn A., Skonieczna M., Wiszniowski J., **2013**, Methods for Detection of Viruses in Water and Wastewater, *Advances in Microbiology*, Vol.3, Vol.5, p. 442–449, DOI:10.4236/aim.2013.35060.

[345] Kim J., Lim J., Lee Ch., **2013**, Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations, *Biotechnology Advances*, Vol. 31, Issue 8, p. 1358–1373, ISSN 0734-9750, DOI:10.1016/j.biotechadv.2013.05.010, (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975013000918>).

[346] Shannon K.E., Lee D.-Y., Trevors J.T., Beaudette L.A., **2007**, Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment, *Science of The Total Environment*, Vol. 382, Issue 1, p. 121–129, ISSN 0048-9697, DOI:10.1016/j.scitotenv.2007.02.039. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969707002963>).

[347] Kaetzke A., Jentsch D., Eschrich K., **2005**, Quantification of *Microthrix parvicella* in activated sludge bacterial communities by real-time PCR. *Lett Appl Microbiol* 40, p. 207–11.

[348] Vervaeren H., De Wilde K., Matthys J., Boon N., Raskin L., Verstraete W., **2005**, Quantification of an Eikelboom type 021N bulking event with fluorescence in situ hybridization and real-time PCR. *Appl Microbiol Biotechnol* 68, p. 695–704.

[349] Asvapathanagul P., Huang Z., Gedalanga P.B., Baylor A., Olson B.H., Interaction of operational and physicochemical factors leading to *Gordonia amarae*-like foaming in an incompletely nitrifying activated sludge plant. *Appl Environ Microbiol* 78, p. 8165–75.

[350] Hall S.J., Hugenholtz P., Siyambalapitiya N., Keller J., Blackall L.L., **2002**, The development and use of real-time PCR for the quantification of nitrifiers in activated sludge. *Water Sci Technol* 46, p. 267–72.

[351] Ahn J.H., Yu R., Chandran K., **2008**, Distinctive microbial ecology and biokinetics of autotrophic ammonia and nitrite oxidation in a partial nitrification bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 100, p.1078–87.

[352] Harms G., Layton A.C., Dionisi H.M., Gregory I.R., Garrett V.M., Hawkins S.A., et al., **2003**, Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environ Sci Technol* 37, p. 343–51.

-
- [353] Layton A.C., Dionisi H., Kuo H.W., Robinson K.G., Garrett V.M., Meyers A., et al., **2005**, Emergence of competitive dominant ammonia-oxidizing bacterial populations in a full-scale industrial wastewater treatment plant. *Appl Environ Microbiol* 71, p.1105–8.
- [354] Huang Z., Gedalanga P.B., Asvapathanagul P., Olson B.H., Influence of physicochemical and operational parameters on Nitrobacter and Nitrospira communities in an aerobic activated sludge bioreactor. *Water Res* 44, p. 4351–8.
- [355] Tsushima I., Kandaichi T., Okabe S., **2007**, Quantification of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in enrichment cultures by real-time PCR. *Water Res* 41, p. 785–94.
- [356] Ma B., Peng Y., Zhang S., Wang J., Gan Y., Chang J., et al., **2006**, Performance of anammox UASB reactor treating low strength wastewater under moderate and low temperatures. *Bioresour Technol* 129, p. 606–11.
- [357] Liu B., Zhang F., Feng X., Liu Y., Yan X., Zhang X., et al., **2006**, Thauera and Azoarcus as functionally important genera in a denitrifying quinoline-removal bioreactor as revealed by microbial community structure comparison. *FEMS Microbiol Ecol* 55, p. 274–86.
- [358] He S., Gall D.L., McMahon K.D., **2007**, “Candidatus Accumulibacter” population structure in enhanced biological phosphorus removal sludges as revealed by polyphosphate kinase genes. *Appl Environ Microbiol* 73, p. 5865–74.
- [359] Lee D-Y, Shannon K., Beaudette L.A., **2006**, Detection of bacterial pathogens in municipal wastewater using an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR. *J Microbiol Methods* 65, p. 453–67.
- [360] Ibekwe A.M., Watt P.M., Grieve C.M., Sharma V.K., Lyons S.R., **2002**, Multiplex fluorogenic real-Time PCR for detection and quantification of Escherichia coli O157:H7 in dairy wastewater wetlands. *Appl Environ Microbiol* 68, p. 4853–62.
- [361] Agudelo R.M., Codony F., Adrados B., Fittipaldi M., Penuela G., Morato J., **2010**, Monitoring bacterial faecal contamination in waters using multiplex real-time PCR assay for Bacteroides spp. and faecal enterococci. *Water SA* 36, p. 27–32.
- [362] Toze S., **1999**, PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater, *Water Research*, Vol. 33, Issue 17, p. 3545–3556, ISSN 0043-1354, DOI:10.1016/S0043-1354(99)00071-8. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135499000718>).
- [363] Suchy i in. **2003**, Dokumentacja techniczna udostępniona przez Miejską Oczyszczalnię Ścieków w Tarnobrzegu
- [364] Żmuda 2011, Dokumentacja techniczna udostępniona przez Miejską Oczyszczalnię Ścieków w Tarnobrzegu
- [365] Maj K., Masłoń A., **2015**, Wieloparametryczna ocena efektywności oczyszczalni ścieków w Rzeszowie przed modernizacją, *Czasopismo Inżynierii Lądowej, Środowiska I Architektury Journal Of Civil Engineering, Environment And Architecture JCEEA*, t. XXXII, z. 62 (1/15), p. 299-315
- [366] Materiały informacyjne udostępnione przez Miejskie Przedsiębiorstwo Wodociągów i Kanalizacji Sp. z o. o. w Rzeszowie.
- [367] Program ochrony środowiska Miasta Rzeszowa na lata 2013-2016 z uwzględnieniem zadań zrealizowanych w 2013 roku oraz perspektywą na lata 2017-2020, 2003
- [368] Mpwik sp. z o.o., <https://mpwik.rzeszow.pl/oczyszczalnia/> (dostęp na dzień: 19.03.2024)

-
- [369] OMC Envag, **2023**, Metody poboru próbek ścieków do badań — sprawdź jak spełnić wymogi Normy 5667-10:2021 <https://envag.com.pl/baza-wiedzy/metody-poboru-probek-sciekow-do-badan-sprawdz-jak-spelnic-wymogi-normy-5667-102021/> (dostęp na dzień: 11.06.2024)
- [370] Dobry farmer, Biopreparat Bio Trakt Plus, <https://dobryfarmer.pl/product-pol-202-Bio-Trakt-20-0L.html> (dostęp na dzień: 16.05.2024)
- [371] Mazur A., Wagner A., Mazur R., Bedla D., **2020**, Bioremediacja mikrobiologiczna zdegradowanych wód jako alternatywa dla metod chemicznego oczyszczania zbiorników wodnych, *Przemysł Chemiczny* Vol. 1 Issue 9, p.1344-1347, DOI: 10.15199/62.2020.9.18 https://www.researchgate.net/publication/344636897_Bioremediacja_mikrobiologiczna_zdegradowanych_wod_jako_alternatywa_dla_metod_chemicznego_oczyszczania_zbiornikow_wodnych
- [372] ACS Poland, Biopreparaty ACS <http://acspoland.eu/oferta/> (dostęp na dzień: 16.05.2024)
- [373] Mazur R., Kowalewski Z., Wagner A., Włodyka-Bergier A., **2022**, Zawansowane procesy rewitalizacji wody w zbiorniku zaporowym Pasternik w Starachowicach, *Przemysł Chemiczny* Vol. 101 Issue 9, p. 470-474, DOI: 10.15199/62.2022.9.? <https://starachowice.eu/bioremediacja-zalewu-pasternik/publikacje-naukowe>
- [374] Probioem, biopreparat EmFarma <https://probioem.pl/glowna/311-emfarma-butelka-1-litr.html> (dostęp na dzień: 16.05.2024)
- [375] Jagodnik.pl, biopreparat QUANTUM <https://jagodnik.pl/amerykanske-preparaty-mikrobiologiczne-juz-polskim-ryнку/> (dostęp na dzień: 16.05.2024)
- [376] ErumAqua, biopreparat QUANTUM <https://erumaqua.pl/preparat-biologiczny-microbe-lift-quantum-light-18-92l.html> (dostęp na dzień: 16.05.2024)
- [377] NCH, biopreparat FreeFlow <https://www.ncheurope.com/en/products/facilities-product/freeflow-liquid/> (dostęp na dzień: 16.05.2024)
- [378] Greenland Technologia Em, biopreparat Em Probiotyki, <https://greenland.pl/produkt/em-probiotyki-dla-drobieu/> (dostęp na dzień: 16.05.2024)
- [379] Greenland Technologia Em, biopreparat Em White Refresh <https://greenland.pl/produkt/em-white-refresh/> (dostęp na dzień: 16.05.2024)
- [380] Falaem, biopreparat Em Bio <https://falaem.pl/efektywne-mikroorganizmy-em-bio-oczyszczanie-sciekow> (dostęp na dzień: 16.05.2024)
- [381] Greenland Technologia Em, biopreparat Em Bio <https://greenland.pl/produkt/em-bio/> (dostęp na dzień: 16.05.2024)
- [382] Artichowicz W., Luczkiewicz A., Sawicki J.M., **2020**, Analysis of the Radiation Dose in UV-Disinfection Flow Reactors, *Water*, Vol.12, Issue 1, 231; DOI:10.3390/w12010231 [Water | Free Full-Text | Analysis of the Radiation Dose in UV-Disinfection Flow Reactors \(mdpi.com\)](https://www.mdpi.com/2076-3417/12/1/231)
- [383] Bolton, J.R.; Linden, K. **2003**, Standardization of methods for fluence (UV dose) determination in bench-scale UV experiments, *J. Env. Eng.* 129, p. 209–216
- [384] Włodyka-Bargiel A., Bargiel T., **2015**, Badania wpływu promieniowania nadfioletowego na stabilność mikrobiologiczną wody, *Ochrona Środowiska*, Vol.37, Issue 4, p. 47- 50

-
- [385] Lehtola M., Miettinen I.T., Vartiainen T., Myllykangas T., Martikainen P.J., **2001**, Microbially available organic carbon, phosphorus, and microbial growth in ozonated drinking water, *Water Research*, Vol. 35, Issue 7, p 1635-1640, DOI: 10.1016/S0043-1354(00)00449-8
- [386] Wang Q., Tao T., Xin K., **2014**, Experimental study using the dilution incubation method to assess water biostability, *Journal of Environmental Sciences*, Vol. 26, Issue 10, p. 1994-2000, DOI: 10.1016/j.jes.2014.07.011
- [387] Steinka I., **2017**, Ocena stabilności mikrobiologicznej żywności typu fast food, *Zeszyty Naukowe Akademii Morskiej w Gdyni*, Nr 99/2017, 48–55 ISSN 1644-1818 e-ISSN 2451-2486
- [388] Michałkiewicz M., **2019**, Metody badań mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza na terenach oczyszczalni ścieków – przegląd literaturowy, *Kosmos. Problemy nauk biologicznych, Tom 68 nr 3(324)*, p. 475-487 (<https://kosmos.ptpk.org/index.php/Kosmos/article/view/2611/2540>)
- [389] Złotkowska H., Juszczakiewicz D., Misiewicz A., **2005**, Charakterystyka właściwości probiotycznych bakterii kwasu mlekowego izolowanych z przewodu pokarmowego kurczaków, *Prace Instytutów i Laboratoriów Badawczych Przemysłu Spożywczego t. 60 (PDF)* Charakterystyka właściwości probiotycznych bakterii kwasu mlekowego izolowanych z przewodu pokarmowego kurczaków / Isolation of Lactic Acid Bacteria as Probiotics Strains from Chicken Gut (researchgate.net)
- [390] Kłębukowska L., **2012**, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie; Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności Przedmiot: Mikrobiologia Żywności, Ćwiczenie 4 i 5 tech_cw4_5.pdf (uwm.edu.pl)
- [391] PN-EN ISO 6222: 2004. Jakość wody. Oznaczenie ilościowe mikroorganizmów zdolnych do wzrostu. Określenie ogólnej liczby kolonii metodą posiewu na agarze odżywczym.
- [392] Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie; Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności Przedmiot: Mikrobiologia Żywności, Temat: Metody ilościowe w mikrobiologicznych badaniach żywności. https://uwm.edu.pl/wnz/sitefiles/file/mikrobiologia/%C4%87wiczenie_7,8-M%C5%BB-Mikrobiologia.pdf (dostęp na dzień: 22.05.2024)
- [393] Dolecka J., **1999**, Efektywność wybranych biopreparatów w oczyszczaniu ścieków bytowo-gospodarczych w kanalizacji bezodpływowej, *Zeszyty Naukowe Politechniki Białostockiej. Inżynieria Środowiska Z.* 11 p. 61-91 (<https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.baztech-article-BPB1-0003-0010>)
- [394] Kielb-Sotkiewicz I., Zamorska J., **2024**, The use of UVC radiation supported by biopreparations for disinfection of treated sewage, *Water Policy Special Issue Circular Economy Policies for Water and Wastewater*, Submissions Being Processed
- [395] Fowoyo P. T., Uzoma E. O., **2015**, Studies on the Antifungal Activity of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* on Spoilage Fungi of Tomato Fruit, *Journal of Microbiology Research*, Vol.5, p. 95-100
- [396] Szymanski, N., Patterson, R.A., **2003**, Effective microorganisms (EM) and wastewater systems, *Future Directions For On-Site Systems: Best Management Practice Proceedings of On-Site 3*, p. 347-354
- [397] Shalaby, E.A., **2011**, Prospects of effective microorganisms technology in wastes treatment in Egypt, *Asian Pacific journal of tropical biomedicine* p. 243-248.
- [398] Szejniuk B., Korytkowski B., Traczykowski A., **2013**, Przeżywalność pałeczek *Salmonella* Senftenberg W775 w płynnych odchodach zwierzęcych, *Rocznik Ochrona Środowiska*, Tom 15, p. 2738-2749

-
- [399] Wroński G., Szejniuk B., Affelska M., **2010**, Wpływ preparatu EM na przeżywalność bakterii wskaźnikowych Salmonella Senftenberg W775 w gnojowicy bydłowej, *Woda- Środowisko- Obszary wiejskie*, Tom 10 z 2(30), p. 223-231
- [400] Novik G., Meerovskaya O., Savich V., **2017**, Waste Degradation and Utilization by Lactic Acid Bacteria: Use of Lactic Acid Bacteria in Production of Food Additives, Bioenergy and Biogas, *from the edited volume Food Additives Edited by Desiree Nedra Karunaratne and Geethi Pamunuwa* (<https://www.intechopen.com/chapters/55776>)
- [401] Manoharan R.K., **2024**, Role of Environmental Microorganisms in Wastewater Treatment, *A special issue of Water (ISSN 2073-4441). This special issue belongs to the section "Wastewater Treatment and Reuse"*. (https://www.mdpi.com/journal/water/special_issues/C609QA064G)
- [402] Qadir G., **2019**, Yeast a magical microorganism in the wastewater Treatment, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* Vol. 8, Issue 4, p.1498-1500 (8-4-227-172.pdf (phytojournal.com))
- [403] Nicula N-O., Lungulescu E-M., Rimbu G.A., Marinescu V., Corbu V.M., Csutak O., **2023**, Bioremediation of Wastewater Using Yeast Strains: An Assessment of Contaminant Removal Efficiency, *Int. J. Environ. Res. Public Health* Vol. 20, Issue 6, p. 4795, DOI:10.3390/ijerph20064795 (<https://www.mdpi.com/1660-4601/20/6/4795>)
- [404] Maicas S., **2020**, The Role of Yeasts in Fermentation Processes, *Microorganisms* Vol., 8, Issue 8, p. 1142; DOI:10.3390/microorganisms8081142 (<https://www.mdpi.com/2076-2607/8/8/1142>)
- [405] Devanshi S., Shah K.R., Arora S., Saxena S., **2021**, Actinomycetes as An Environmental Scrubber, *from the edited volume Crude Oil - New Technologies and Recent Approaches Edited by Manar Elsayed Abdel-Raouf and Mohamed Hasan El-Keshawy (Actinomycetes as An Environmental Scrubber | IntechOpen)*
- [406] American Water Works Association, **2004**, Problem Organisms in Water: Identification and Treatment m7lookinside.pdf (awwa.org)_(dostęp na dzień: 01.07.2024)
- [407] Trabelsi I., Soltane R., Hassine-Zaafrane M., Alasiri A., Albogami B., Nour M., **2022**, Study of the Antimicrobial Potential of Actinomycetes Isolated from Organic and Inorganic Waste, *Current Microbiology*, Vol. 79, article number 37
- [408] Kasza, P., **2005**, Zastosowanie biopreparatów do zwiększania efektywności hydraulicznego szczelinowania skał, *Wiertnictwo, Nafta, Gaz*, 22, 1, p. 179–189
- [409] Hilberath T., Raffaele A., Windeln L.M., Urlacher V.B., **2021**, Evaluation of P450 monooxygenase activity in lyophilized recombinant E. coli cells compared to resting cells, *AMB Expr* 11, 162, DOI: 10.1186/s13568-021-01319-0 IDT-Biologika-Lyophilization-vs-Liquid-Formulation.pdf
- [410] Sapieha-Waszkiewicz, A., Marjańska-Cichoń, B., Miętkiewski, R., Żurek, M., **2005**, Reakcja grzybów owadobójczych na fungicydy pochodzenia roślinnego i syntetycznego in vitro, *Acta Agrobot.*, Vol. 58, Issue 1, p. 101–111, DOI:10.5586/aa.2005.016
- [411] Molina, F., López-Acedo, E., Tabla, R. et al., **2015**, Improved detection of Escherichia coli and coliform bacteria by multiplex PCR., *BMC Biotechnol*, Vol.15, Issue 48, DOI:10.1186/s12896-015-0168-2
- [412] Dacosta N., Fowler S., Germann P., Lam M., Victor R., **2002**, Quantitative Assessment of the Effect of Glucose, Lactose and Sucrose on the Production of β -Galactosidase, *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)* Vol. 2, p.124-129 (2-124.pdf (ubc.ca))

-
- [413] Bodzek M., **2013**, Przegląd możliwości wykorzystania technik membranowych w usuwaniu mikroorganizmów i zanieczyszczeń organicznych ze środowiska wodnego, *Inżynieria i Ochrona Środowiska*, t. 16, nr 1, s. 5-37
- [414] Maleszewska J., Ziemińska S., Haman S., Miłkowska-Jankowska D. **1980**, Paciorkowce kałowe jako wskaźnik kałowego zanieczyszczenia wody, *Roczn. PZH*, 31, 5.
- [415] Dyrektywa Rady 76/160 EWG z dnia 8 grudnia 1975 r. dotycząca jakości wody w kąpieliskach (ze zmianami).
- [416] Bonetta S., Pignata C., Bonetta S., Amagliani G., Brandi G., Gilli G., Carraro E., **2021**, Comparison of UV, Peracetic Acid and Sodium Hypochlorite Treatment in the Disinfection of Urban Wastewater, *Pathogens*, Vol. 10(2):182, DOI:10.3390/pathogens10020182
- [417] Finney M., Smullen J., Foster H.A., Brokx S., Storey D.M., **2003**, Evaluation of Chromocult coliform agar for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae from faecal samples from healthy subjects, *Journal of Microbiological Methods* 54 (2003) p. 353 – 358 (22885-mk.pdf (sigmaaldrich.com))
- [418] Pe´rez, J.L., Berrocal, C.I., Berrocal, L., **1986**, Evaluation of a commercial h-glucuronidase test for the rapid and economical identification of Escherichia coli., *J. Appl. Bacteriol.* 61, p. 541–545.
- [419] Sarhan, H.R., Foster, H.A., **1990**, A rapid fluorogenic medium for the detection of Escherichia coli by the production of h-glucuronidase, *J. Appl. Bacteriol.* 70, p. 394–400
- [420] Gauthier, M.J., Torregrossa, V.M., Babelona, M.C., Cornax, R., Borrego, J.J., **1991**, An intercalibration study of the use of 4-methylumbelliferyl-h-D-glucuronide for the specific enumeration of E. coli in seawater and marine sediments, *Syst. Appl. Microbiol.* 14, p. 183–189.
- [421] Alonso, J.L., Amoros, I., Alonso, M.A., **1996**, Differential susceptibility of aeromonads and coliforms to Cefsulodin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, p. 1885–1888.
- [422] Alonso, J.L., Soriano, A., Carbajo, O., Amoros, I., Garelick, H., **1999**, Comparison and recovery of Escherichia coli and other motolerant coliforms in water with a chromogenic medium incubated at 41 and 44.5 °C. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, p. 3746–3749.
- [423] Geissler, K., Manafı, M., Amoros, I., Alonso, J.L., **2000**, Quantitative determination of total coliforms and E. coli in marine waters with chromogenic and fluorogenic media. *J. Appl. Microbiol.* 88, p. 280–285.
- [424] Fiałkowska, E., B. Klimek, A. Marchlewicz, W. Kocerba-Soroka, J. Starzycka, A. Walczyńska i A. Pajdak-Stós, **2019**, Różnorodność i funkcja zbiorowiska drobnoustrojów pod silną presją selekcyjną wrotków. *J. Podstawowy mikrobiol.* 59: p. 775–783.
- [425] Life Science, **2023**, Wrotki Lecane inermis: Ekologiczna i Ekonomiczna Rewolucja w Oczyszczalniach Ścieków, <https://lifescience.pl/miesiac-partnera-klastra/wrotki-lecane-inermis-ekologiczna-i-ekonomiczna-rewolucja-w-oczyszczalniach-sciekow/> (dostęp na dzień: 13.06.2024)
- [426] Walczyńska A., Sobczyk M., **2022**, Experimental Evolution Shows Body Size Decrease in Response to Hypoxia, with a Complex Effect on Plastic Size Response to Temperature, *The Biological Bulletin*, Vol. 243, Number 2, DOI: 10.1086/722028, <https://www.journals.uchicago.edu/doi/full/10.1086/722028>
- [427] Walczyńska A., Sobczyk M., **2021**, Aerobic scope does matter in the temperature–size rule, but only under optimal conditions, *Journal of Experimental Biology*, 224 (23), DOI: 10.1242/jeb.242884

<https://journals.biologists.com/jeb/article/224/23/jeb242884/273625/Aerobic-scope-does-matter-in-the-temperature-size>

[428] Cutler, T.D.; Zimmerman, J.J., **2011**, Ultraviolet irradiation and the mechanisms underlying its inactivation of infectious agents. *Anim. Health Res. Rev.* 12(1); p.15–23

[429] Hallmich C, Gehr R., **2010**, Effect of pre- and post-UV disinfection conditions on photoreactivation of fecal coliforms in wastewater effluents. *Water Res*, 44, p. 2885–2893 DOI:10.1016/j.watres.2010.02.003

[430] Nakano T., Xu X., Salem A.M.H., Shoukamy M.I., Ide H., **2017**, Radiation-induced DNA–protein cross-links: Mechanisms and biological significance, *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 107, p. 136-145, DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.041

[431] Lazarotto J.S., Junior E.P.M., Medeiros R.C., Volpatto F., Silvestri S., **2022**, Sanitary sewage disinfection with ultraviolet radiation and ultrasound, *International Journal of Environmental Science and Technology* Vol. 19, p.11531–11538 s13762-021-03764-7.pdf (springer.com)

[432] Salcedo Dávila I., Andrade Balao J.A., Quiroga Alonso, J.M., Nebot Sanz, E., **2008**, Pilot Plan protocol for optimization of UV dose required to obtain an appropriate municipal wastewater disinfection. *J. Water Supply Res. Technol.* Vol. 57, p. 57–63.

[433] Nguyen, T.M.H. Suwan, P. Koottatep, T. Beck, S.E., **2019**, Application of a novel, continuous-feeding ultraviolet light emitting diode (UV-LED) system to disinfect domestic wastewater for discharge or agricultural reuse. *Water Res.* Vol. 153, p. 53–62

[434] Silva, I. Tacão, M. Tavares, R.D.S. Miranda, R. Araújo, S. Manaia, C.M. Henriques, I., **2018**, Fate of cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae and ESBL-producers over a full-scale wastewater treatment process with UV disinfection. *Sci. Total Environ.* Vol. 639, p. 1028–1037

[435] Rodríguez-Chueca, J. Laski, E. García-Cañibano, C. Martín de Vidales, M.J. Encinas, Á. Kuch, B. Marugán, J., **2018**, Micropollutants removal by full-scale UV-C/sulfate radical based Advanced Oxidation Processes. *Sci. Total Environ.* Vol. 630, p.1216–1225.

[436] Caretti, C. Lubello, C., **2003**, Wastewater disinfection with PAA and UV combined treatment: A pilot plant study. *Water Res.* Vol. 37, p. 2365–2371.

[437] Milani S.J., Bidhendi G.N., **2022**, A Review on the Potential of Common Disinfection Processes for the Removal of Virus from Wastewater, *International Journal of Environmental Research*, Vol. 16, article number 9, DOI: 10.1007/s41742-021-00387-1

[438] Khodadadi, M., Khorami-Pour, S., Askari, H. *et al.*, **2022**, Investigating Disinfection Efficiency and Regrowth Control of Microorganisms in Urban Sewage Effluent Using Ultraviolet Radiation, Ozone, Gamma-Ray, and Dielectric Barrier Discharge Plasma. *Water Air Soil Pollut*, 233, 49, <https://doi.org/10.1007/s11270-022-05965-3>

[439] Salcedo I., Andrade J.A., Quiroga J.M., Nebot E., **2007**, Photoreactivation and dark repair in UV-treated microorganisms: effect of temperature., *Appl Environ Microbiol.*, Vol.73, Issue 5, p.1594-600 (2007). DOI: 10.1128/AEM.02145-06.

[440] Livneh Z., Cohen-Fix O., Skaliter R., Tamar Elizur T., **1993**, Replication of Damaged DNA and the Molecular Mechanism of Ultraviolet Light Mutagenesis, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 28:6, 465-513 DOI: 10.3109/10409239309085136.

[441] Collivignarelli M.C., Abbà A, Benigna I., Sorlini S., Toretta V., **2018**, Overview of the Main Disinfection Processes for Wastewater and Drinking Water Treatment Plants, *Sustainability*, 10, 86

-
- [442] Guo, M. Hu, H. Bolton, J.R. El-Din, M.G., **2009**, Comparison of low- and medium-pressure ultraviolet lamps: Photoreactivation of *Escherichia coli* and total coliforms in secondary effluents of municipal wastewater treatment plants. *Water Res.* Vol. 43, p. 815–821.
- [443] Guo, M. Huang, J. Hu, H. Liu, W. Yang, J., **2012**, UV inactivation and characteristics after photoreactivation of *Escherichia coli* with plasmid: Health safety concern about UV disinfection, *Water Res.* Vol. 46, p. 4031–4036.
- [444] Emerick R.W., Loge F.J., Ginn T., Darby J.L., **2000**, Modeling the inactivation of particle-associated coliform bacteria. *Water Environment Research* 72, p. 432-438
- [445] Grudziński M., Pietruszka A., Sawicki W., **2015**, Anaerobic digestion in sanitization of pig slurry and biomass in agricultural biogas plant. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 5, p. 524–526.
- [446] Dodd M. C., **2012**, Potential impacts of disinfection processes on elimination and deactivation of antibiotic resistance genes during water and wastewater treatment., *Journal of Environmental Monitoring* 14, p. 1754–1771
- [447] Cao H., Wang J., Kim J.H., Guo Z., Xiao J., Yang J., Chang J., Shi Y., Xie Y., **2021**, Different roles of Fe atoms and nanoparticles on g-C₃N₄ in regulating the reductive activation of ozone under visible light. *Applied Catalysis B: Environmental Journal* 296, p. 120362.
- [448] Pavon-Dominguez P., Plocoste T., **2021**, Coupled multifractal methods to reveal changes in nitrogen dioxide and tropospheric ozone concentrations during the COVID-19 lockdown, *Atmospheric Research* 261, p. 105755.
- [449] Hao Yin et al, **2021** Unprecedented decline in summertime surface ozone over eastern China in 2020 comparably attributable to anthropogenic emission reductions and meteorology. *Environmental Research Letters* 16, 124069.
- [450] Heß S, Gallert C., **2015**. Sensitivity of antibiotic resistant and antibiotic susceptible *Escherichia coli*, *Enterococcus* and *Staphylococcus* strains against ozone. *Journal of Water and Health* 13, p. 1020–1028.
- [451] Martinelli M., Giovannangeli F., Rotunno S., Trombetta C.M., Montomoli E., **2017**. Water and air ozone treatment as an alternative sanitizing technology. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene* 58, p. 48–52.
- [452] Xu P., Janex M.-L., Savoye P., Cockx A., Lazarova V., **2002**, Wastewater disinfection by ozone: main parameters for process design. *Water Research* 36, p. 1043–1055.
- [453] Gehr R., Wagner M., Veerasubramanian P., Payment P., **2003**, Disinfection efficiency of peracetic acid, UV and ozone after enhanced primary treatment of municipal wastewater. *Water Research* 37, p. 4573–4586.
- [454] Lüddecke F., Heß S., Gallert C., Winter J., Güde H., Löffler H., **2015**, Removal of total and antibiotic-resistant bacteria in advanced wastewater treatment by ozonation in combination with different filtering techniques. *Water Research* 69, p. 243–251
- [455] Janex M.L., Savoye P., Roustan M., Do-Qunag Z., Laine J.M., Lazarova V., **2008**, Wastewater Disinfection by Ozone: Influence of Water Quality and Kinetics Modeling, *Ozon., Science & Engineering*, 22, p. 113-121.
- [456] Bader H., **2008**, Determination of Ozone In Water By The Indigo Method: A Submitted Standard Method, A Submitted Standard Method, *Ozone. Science & Engineering*, 4, p. 169-176.

[457] Quant B. et al., **2014**, Possibilities of disinfection of biologically treated sewage on the example of the "Wschód" sewage treatment plant in Gdańsk", *Marine Engineering and Geotechnology* 5, p. 397-406.

[458] Bergel T., **2020**, Chlor czy ozon - o dezynfekcji ścieków słów kilka... (<https://www.pfsz.org/wp-content/uploads/2020/04/Chlor-czy-ozon-dezynfekcja-%C5%9Bciek%C3%B3w.pdf>) (dostęp na dzień: 03.07.2024)

[459] Kasuga I., Nakamura H., Kurisu F., Furumal H., **2021**, Characterization of microbial regrowth potential shaped by advanced drinking water treatment. *H2Open Journal*, 4, p. 157–166.

[460] Hammes F., Goldschmidt F., Vital M., Egli T., **2010**, Measurement and interpretation of microbial adenosine tri-phosphate (ATP) in aquatic environments, *Water Res* Vol. 44(13), p. 3915-23, DOI:10.1016/j.watres.2010.04.015.

[461] Zamorska J., Kielb-Sotkiewicz I., **2023**, Ozonation in wastewater disinfection, *CEER* 2023;33 (1): 0001-003 E-ISSN 2450-8594