

Brigita Daļecka

MIKROSKOPISKO SĒŅU IZMANTOŠANA SADZĪVES NOTEKŪDEŅU ATTĪRĪŠANĀ NO FARMACEITISKI AKTĪVAJĀM VIELĀM

Promocijas darba kopsavilkums



RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE (RTU)

Būvniecības inženierzinātņu fakultāte
Siltuma, gāzes un ūdens tehnoloģijas institūts

KARALISKAIS TEHNOLOĢIJU INSTITŪTS (KTH)

Ķīmijas, biotehnoloģijas un veselības inženierzinātņu fakultāte

Brigita Daļeckā

RTU doktora studiju programmas “Siltuma, gāzes un ūdens tehnoloģija” doktorante
KTH doktora studiju programmas “Biotehnoloģija” doktorante

MIKROSKOPISKO SĒŅU IZMANTOŠANA SADZĪVES NOTEKŪDEŅU ATTĪRĪŠANĀ NO FARMACEITISKI AKTĪVAJĀM VIELĀM

Promocijas darba kopsavilkums

Zinātniskie vadītāji:

profesors *Dr. sc. ing.*
TĀLIS JUHNA

pētniece *Dr.*
GUNARATNA KUTTAVA RAJARAO

RTU Izdevniecība
Rīga un Stokholma 2021

Daļeckā, B. Mikroskopisko sēņu izmantošana sadzīves notekūdeņu attīrīšanā no farmaceitiski aktīvajām vielām. Promocijas darba kopsavilkums. Rīga: RTU Izdevniecība, 2021. 22 lpp.

Iespiests saskaņā ar promocijas padomes "RTU P-12" 2020. gada 3. decembra lēmumu, protokols Nr. 197.17.

<https://doi.org/10.7250/9789934226021>

ISBN 978-9934-22-602-1 (pdf)

PROMICIJAS DARBS IZVIRZĪTS ZINĀTNES DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI RĪGAS TEHNISKĀJĀ UNIVERSITĀTĒ

Promocijas darbs zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts tiešsaistes sēdē 2021. gada 26. martā plkst. 11 RTU konferenču zālē, Āzenes ielā 6, un Zviedrijas Karaliskajā institūtā (*KTH*), F3 telpā, *Lindstedtsvägen* ielā 26, Stokholmā.

OFICIĀLIE RECENZENTI

Profesors *Nelson Lima*,
Universidade do Moinho, Portugāle

Dr. habil. sc. ing. Paul Van der Wielen,
KWR Water Research Institute, Nīderlande

APSTIPRINĀJUMS

Apstiprinu, ka esmu izstrādājusi šo promocijas darbu, kas iesniegts izskatīšanai RTU un *KTH* kopējā zinātnes doktora grāda iegūšanai. Promocijas darbs zinātniskā grāda iegūšanai nav iesniegts nevienā citā universitātē.

Brigita Daļeckā (paraksts)

Datums:

Promocijas darbs ir uzrakstīts angļu valodā, tajā ir ievads, četras nodaļas, secinājumi, literatūras saraksts, 14 attēlu, četras tabulas, četri pielikumi, kopā 68 lappuses, neskaitot pielikumus. Literatūras sarakstā ir 133 nosaukumi.

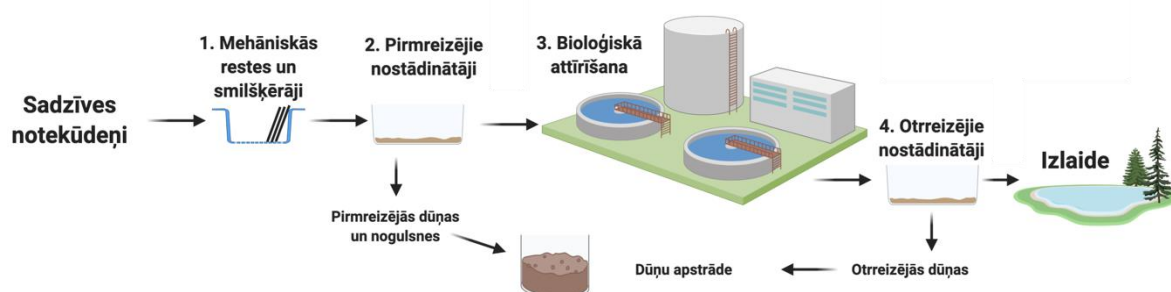
SATURS

DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS.....	5
Pētījuma aktualitāte	5
Darba mērķis	6
Darba novitāte un praktiskais lietojums	6
Metodoloģija un galveno nodaļu apraksts	6
REZULTĀTI UN DISKUSIJA	10
Mikroskopisko sēņu izmantošana sadzīves notekūdeņu attīrīšanā no farmaceitiski aktīvajām vielām	10
Mikroskopisko sēņu izolēšana no sadzīves notekūdeņiem	11
Sadzīves notekūdeņu attīrīšana no P, NH ₄ -N un TOC laboratorijas mēroga eksperimentos	13
Sadzīves notekūdeņu attīrīšana no P, NH ₄ -N un TOC pilota mēroga sistēmā	13
Sadzīves notekūdeņu attīrīšana no farmaceitiski aktīvajām vielām pilota mēroga sistēmā	14
Mikroskopisko sēņu izmantošanas izmaksas sadzīves notekūdeņu attīrīšanā.....	15
SECINĀJUMI	16
Rekomendācijas un turpmākie pētījumi	17
DARBA APROBĀCIJA	19
Publikācijas.....	19
Konferences	19
LITERATŪRA.....	20

DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS

Pētījuma aktualitāte

Farmaceitiski aktīvo vielu izplatība virszemes un pazemes ūdeņos mūsdienās ir būtiska vides problēma. Šo vielu izplatība vidē var izraisīt nevēlamu ietekmi ne tikai uz ekosistēmu, bet arī uz cilvēku veselību (*Besha* u. c., 2017). Pašlaik lietotās sadzīves notekūdeņu attīrīšanas tehnoloģijas galvenokārt ir paredzētas notekūdeņu attīrīšanai no bioloģiski noārdāmām organiskām vielām un biogēniem elementiem (*Margot* u. c., 2015) (1. att.). Šīs tehnoloģijas ne vienmēr spēj no notekūdeņiem pilnībā attīrīt bioloģiski inertas vielas, piemēram, farmaceitiski aktīvās vielas (*Cruz-Morató* u. c., 2013). Tādēļ ir nepieciešams izstrādāt jaunas, uzlabotas sadzīves notekūdeņu attīrīšanas metodes un tehnoloģijas, kā arī pilnveidot un optimizēt jau esošās tehnoloģijas (*Yamashita* un *Yamamoto-Ikemoto*, 2014).



1. att. Klasiskā sadzīves notekūdeņu attīrīšanas tehnoloģijas principiālā shēma (izveidots ar *BioRender.com*).

Pēdējā desmitgadē ir pētītas notekūdeņu bioloģiskās attīrīšanas metodes, izmantojot mikroskopiskās sēnes, piemēram, baltās trupes sēnes. Pētījumos pierādīts, ka mikroskopiskās sēnes varētu būt alternatīva metode “klasiskajām” sadzīves notekūdeņu attīrīšanas metodēm, it īpaši attīrīšanai no farmaceitiski aktīvajām vielām. Mikroskopisko sēņu izmantošanas augstais potenciāls skaidrojams ar tām piemītošo ne tikai relatīvi augsto biosorbcijas spēju, bet arī to enzīmu sistēmām, kas izmantojamas organisko un neorganisko savienojumu noārdīšanai (*Lu* u. c., 2016). Pētījumos aprakstīts arī metodes potenciāls tās ekonomiski pamatotai un videi draudzīgai izmantošanai (*Mir-Tutusaus* u. c., 2018). Tomēr līdz šim veiktie pētījumi nav snieguši skaidrus pierādījumus par mikroskopisko sēņu iespējami plašu izmantošanu sadzīves notekūdeņu attīrīšanā, it īpaši reālos vides apstākļos, kur bioreaktorā var novērot augstu mikroorganismu, tajā skaitā mikroskopisko sēņu, daudzveidību (*Espinosa-Ortiz* u. c., 2016). Līdzšinējie pētījumi galvenokārt veikti, izmantojot sintētiskus vai sterilus notekūdeņus, līdz ar to nav izvērtēts, kā dažādu mikroskopisko sēņu vienlaicīga izmantošana ietekmē farmaceitiski aktīvo vielu attīrīšanas efektivitāti un kā tās konkurētu ar citiem sadzīves notekūdeņos esošiem mikroorganismiem.

Darba mērķis

Promocijas darba mērķis ir izvērtēt mikroskopisko sēņu izmantošanas potenciālu farmaceitiski aktīvo vielu attīrīšanā no nesteriliem sadzīves notekūdeņiem bez pH korekcijas. Pētījuma galvenais zinātniskais jautājums ir: *vai mikroskopiskās sēnes spēj attīrīt farmaceitiski aktīvās vielas no nesteriliem sadzīves notekūdeņiem bez pH korekcijas?* Ņemot vērā zinātnisko jautājumu, šī pētījuma veikšanai tika definēti šādi uzdevumi:

- identificēt sadzīves notekūdeņos visbiežāk sastopamās farmaceitiski aktīvās vielas;
- izpētīt mikroskopisko sēņu savstarpējo mijiedarbību un noteikt tās ietekmi uz notekūdeņu attīrīšanas efektivitāti no farmaceitiski aktīvajām vielām;
- identificēt mikroskopisko sēņu farmaceitiski aktīvo vielu attīrīšanas mehānismus;
- izvērtēt nesēju kā mikroskopisko sēņu biomasas palielināšanas metodes izmantošanas ietekmi uz farmaceitiski aktīvu vielu attīrīšanas efektivitāti;
- izolēt mikroskopiskās sēnes no sadzīves notekūdeņiem un pārbaudīt šo izolātu spēju attīrīt sadzīves notekūdeņus no farmaceitiski aktīvajām vielām;
- izpētīt kopējā fosfora (P), amonija slāpekļa ($\text{NH}_4\text{-N}$) un organiskā oglekļa (TOC) attīrīšanas efektivitāti, izmantojot mikroskopiskās sēnes;
- izveidot mikroskopisko sēņu bioreaktoru un pārbaudīt šī bioreaktora lietojumu sadzīves notekūdeņu attīrīšanai no farmaceitiski aktīvajām vielām;
- izpētīt bioaugmentācijas ietekmes efektivitāti, attīrot sadzīves notekūdeņus no farmaceitiski aktīvajām vielām;
- novērtēt izmaksas, kas saistītas ar mikroskopisko sēņu izmantošanu sadzīves notekūdeņu attīrīšanā, un salīdzināt tās ar klasiskajām sadzīves notekūdeņu attīrīšanas metodēm.

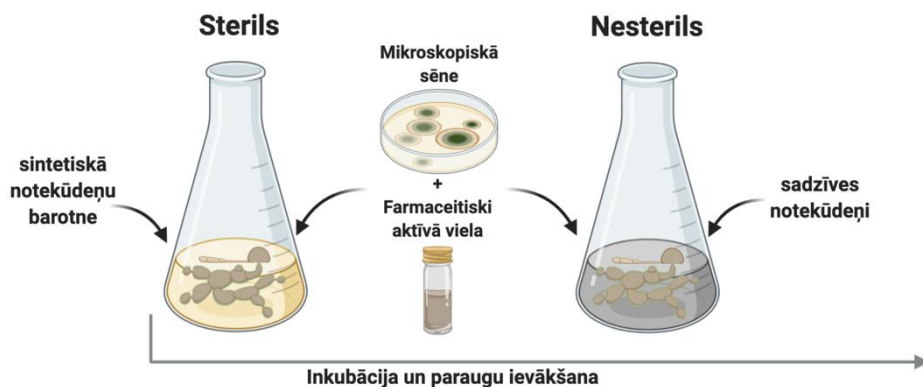
Darba novitāte un praktiskais lietojums

Pētījumā ir pārbaudīta mikroskopisko sēņu farmaceitisko un neorganisko vielu (P, $\text{NH}_4\text{-N}$ un TOC) attīrīšanas efektivitāte no nesteriliem sadzīves notekūdeņiem, neveicot pH līmeņa korekcijas un izmantojot bioaugmentāciju kā nepārtrauktu bioreaktora darbības stratēģiju. Līdz šim šāda veida pieeja mikroskopisko sēņu izmantošanai sadzīves notekūdeņu attīrīšanai no farmaceitiski aktīvajām vielām nav veikta. Promocijas darbā iegūtie rezultāti sniedz ieskatu un zināšanas par mikroskopisko sēņu iespējamo izmantošanu un izmaksām sadzīves notekūdeņu attīrīšanai. Promocijas darbā izstrādāti arī iespējamie mikroskopisko sēņu bioreaktoru izmantošanas un ieviešanas risinājumi sistēmās, kas līdz šim izmanto klasiskās notekūdeņu attīrīšanas metodes.

Metodoloģija un galveno nodaļu apraksts

Promocijas darbs veidots kā tematiski vienota zinātnisko publikāciju kopa. Promocijas darbā ietvertas četras zinātniskās publikācijas. Pētījuma **1. publikācijas** galvenais mērķis ir izpētīt piecu mikroskopisko sēņu – *Trametes versicolor* (TV), *Irpex lacteus* (IL), *Pleurotus*

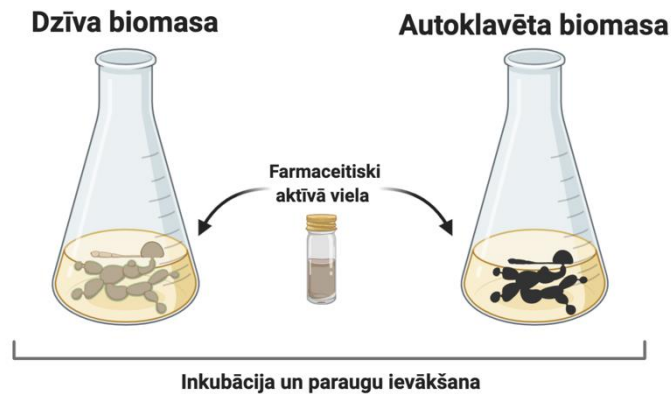
ostreatus (PO), *Trichoderma reesei* (TR) un *Fusarium solani* (FS) – potenciālu farmaceitiski aktīvo vielu attīrīšanai no sadzīves notekūdeņiem. Šajā posmā tika veikti laboratorijas eksperimenti un izpētīta pH ietekme uz notekūdeņu attīrīšanas efektivitāti no farmaceitiski aktīvajām vielām. Tika noskaidrota arī mikroskopisko sēņu savstarpējā mijiedarbība un tās ietekme uz notekūdeņu attīrīšanas efektivitāti, izmantojot dažādas mikroskopiskās sēnes gan atsevišķi, gan dažādās kombinācijās (2. att.).



2. att. Laboratorijas mēroga eksperimenta shēma ar mikroskopiskajām sēnēm sadzīves notekūdeņu attīrīšanai no farmaceitiski aktīvajām vielām (izveidots ar *BioRender.com*).

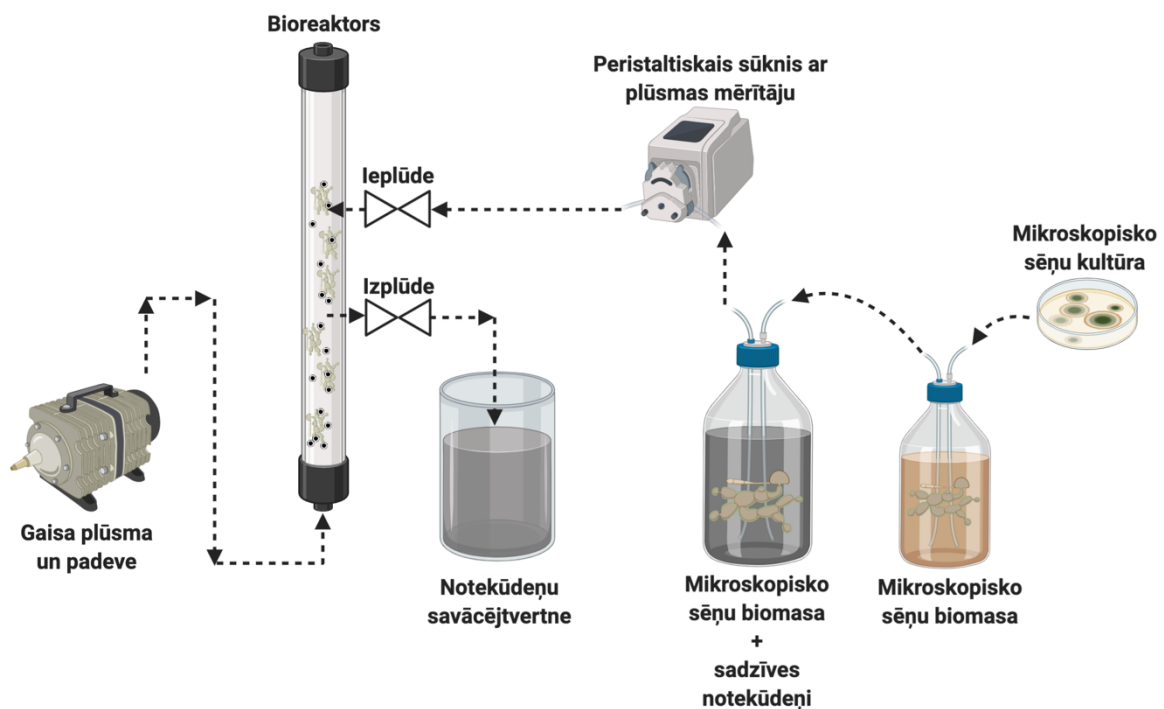
Pētījuma laikā tika pārbaudīta arī nesēju K1 ietekme uz sēņu biomasas veidošanos un noteikta sadzīves notekūdeņu attīrīšanas efektivitāte no farmaceitiski aktīvajām vielām. Lai labāk izprastu farmaceitiski aktīvo vielu attīrīšanas mehānismus, tika veikts biosorbcijas laboratorijas eksperiments.

2. publikācijas galvenais mērķis ir veikt mikroskopisko sēņu izolāciju no sadzīves notekūdeņiem un pārbaudīt izolēto sēņu notekūdeņu attīrīšanas efektivitāti no farmaceitiski aktīvām vielām. Lai sasniegtu šo mērķi, no sadzīves notekūdeņiem tika izolētas sēnes, un tās kultivētas uz sintētiskās notekūdeņu agarizētās barotnes ar farmaceitiski aktīvajām vielām. Eksperimentu laikā tika izvērtēta pH līmeņa ietekme uz farmaceitiski aktīvo vielu attīrīšanas efektivitāti no sadzīves notekūdeņiem. Izolāts ar relatīvi visaugstāko farmaceitiski aktīvo vielu attīrīšanas efektivitāti turpmākā darba gaitā tika identificēts kā *Aspergillus luchuensis*. Tālākā pētījuma gaitā ar *A. luchuensis* tika veikts biosorbcijas eksperiments un noteikta lakāzes enzīma aktivitāte, lai labāk izprastu procesus, kas ietekmē farmaceitisko vielu attīrīšanas efektivitāti no sadzīves notekūdeņiem (3. att.). Lai novērtētu izolētā *A. luchuensis* izmantošanas priekšrocības sadzīves notekūdeņu attīrīšanā no farmaceitiski aktīvajām vielām, visi ar *A. luchuensis* iegūtie rezultāti tika salīdzināti ar *T. versicolor*.



3. att. Biosorbcijas eksperimenta shēma ar mikroskopiskajām sēnēm (izveidots ar *BioRender.com*).

3. publikācijā aprakstīta kopējā fosfora (P), amonija slāpekļa ($\text{NH}_4\text{-N}$) un kopējā organiskā oglekļa (TOC) attīrīšanas efektivitāte no sadzīves notekūdeņiem ar divu mikroskopisko sēņu palīdzību – *T. versicolor* un *A. luchuensis*. Pētījums iekļāva divas darba daļas. Pirmajā darba daļā rezultātu iegūšanai tika veikts laboratorijas eksperiments ar *T. versicolor* un *A. luchuensis*. Šajā posmā tika analizēta P, $\text{NH}_4\text{-N}$ un TOC attīrīšanas efektivitāte no sadzīves notekūdeņiem. Otrajā pētījuma daļā tika izveidots mikroskopisko sēņu bioreaktors. Pēc tam abas mikroskopisko sēņu kultūras – *T. versicolor* un *A. luchuensis* – tika inkubētas bioreaktoros (4. att.). Lai labāk izprastu P, $\text{NH}_4\text{-N}$, TOC un mikroskopisko sēņu mijiedarbību ar mikroorganismiem no sadzīves notekūdeņiem, eksperimenta laikā tika noteiktas pH izmaiņas, lakāzes aktivitāte un veikta kopējo baktēriju skaita noteikšana.



4. att. Mikroskopisko sēņu bioreaktora principiālā shēma (izveidots ar *BioRender.com*).

Promocijas darba **4. publikācijā** tika pārbaudīta bioaugmentācija kā stratēģija mikroskopisko sēņu izmantošanai notekūdeņu attīrīšanai no farmaceitiski aktīvajām vielām. Darba laikā tika optimizēts trešajā posmā izmantotais bioreaktors. Bioaugmentācijas eksperimentā tika izmantotas abas mikroskopisko sēņu kultūras – *T. versicolor* un *A. luchuensis*. Mikroskopisko sēņu biomasas tika inkubētas bioreaktoros. Inkubācijas laikā tika ievākti paraugi, ļaujot analizēt rezultātus par kopējā P, NH₄-N, nitrāta, nitrīta un TOC izmaiņām bioreaktorā. Lai labāk izprastu mikroskopisko sēņu mijiedarbību un adaptāciju ar mikroorganismiem no sadzīves notekūdeņiem, tika noteikta pH vērtības izmaiņas, lakāzes enzīma aktivitāte un veikta kopējo baktēriju skaita noteikšana. Darba noslēgumā tika pārbaudīta un analizēta farmaceitiski aktīvo vielu – diklofenaka, ketoprofēna, karbamazepīna, ibuprofēna, sulfametoksazola un metoprolola – attīrīšanas efektivitāte.

1. tabula

Promocijas darbā izmantoto farmaceitiski aktīvo vielu fizikāli ķīmiskais raksturojums

Farmaceutiski aktīvā viela	Molekulārā formula	Funkcionālā grupa	log K _d	Iedalījums	Izmantotā literatūra	Publikācija
Diklofenaks	C ₁₄ H ₁₁ C ₁₂ NO ₂	Amīns, hlors, karboksilgrupa (–COOH)	2,7	Nesteroīdie pretiekaisuma līdzekļi (NPL)	<i>Baresel</i> u. c., 2015; <i>Carballa</i> u. c., 2004; <i>Kramer</i> u. c., 2018; <i>Martín</i> u. c., 2012; <i>Maurer</i> u. c., 2007; <i>Taheran</i> u. c., 2016; <i>Ternes</i> , 1998; <i>Wang</i> un <i>Wang</i> , 2016; <i>Zahmatkesh</i> u. c., 2017	1., 2., 3. publikācija
Ketoprofēns	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	Karboksilskābes un sāļi, ketoni un ketāli	2,4	Nesteroīdie pretiekaisuma līdzekļi (NPL)		1. un 4. publikācija
Karbamazepīns	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	Heterocikli	1,15	Pretkrampju līdzekļi		2. un 4. publikācija
Ibuprofēns	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	Alkāna aizvietotāji un karbonskābe	2,1	Nesteroīdie pretiekaisuma līdzekļi (NPL)		2. un 4. publikācija
Sulfametoksazols	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	Amīni un amīnu sāļi, heterocikli, sēru saturošas grupas	1,04	Nesteroīdie pretiekaisuma līdzekļi (NPL)		2. un 4. publikācija
Metoprolols	C ₁₅ H ₂₅ NO ₃	Spirti un fenoli, amīnu sāļi, ēteri un oksīdi	2,4	Antihipertensīvie līdzekļi		4. publikācija

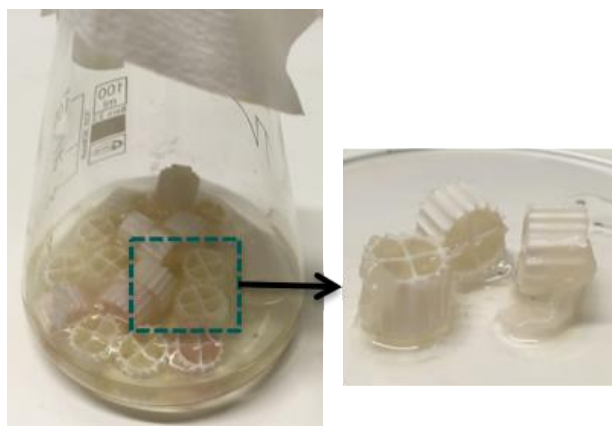
Šajā promocijas darbā kā modeļa farmaceitiski aktīvās vielas tika izvēlēti diklofenaks, ketoprofēns, karbamazepīns, ibuprofēns, sulfametoksazols un metoprolols (1. tab.), ņemot vērā to relatīvi augsto patēriņa līmeni Latvijā un Zviedrijā. Tāpat šie savienojumi ir visvairāk atklātie savienojumi notekūdeņu attīrīšanas iekārtās ieplūstošajos un izplūstošajos notekūdeņos, attiecīgi liecinot par iespējami zemu attīrīšanas efektivitāti klasiskās notekūdeņu attīrīšanas sistēmās (*Baresel* u. c., 2015). Turklāt mikroskopisko sēņu mijiedarbība ar dažādu farmaceitiski aktīvo vielu funkcionālajām grupām var sniegt ieskatu par šo sēņu izmantošanas iespējamību attiecīgās grupas citu savienojumu attīrīšanā.

REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Mikroskopisko sēņu izmantošana sadzīves notekūdeņu attīrīšanā no farmaceitiski aktīvajām vielām

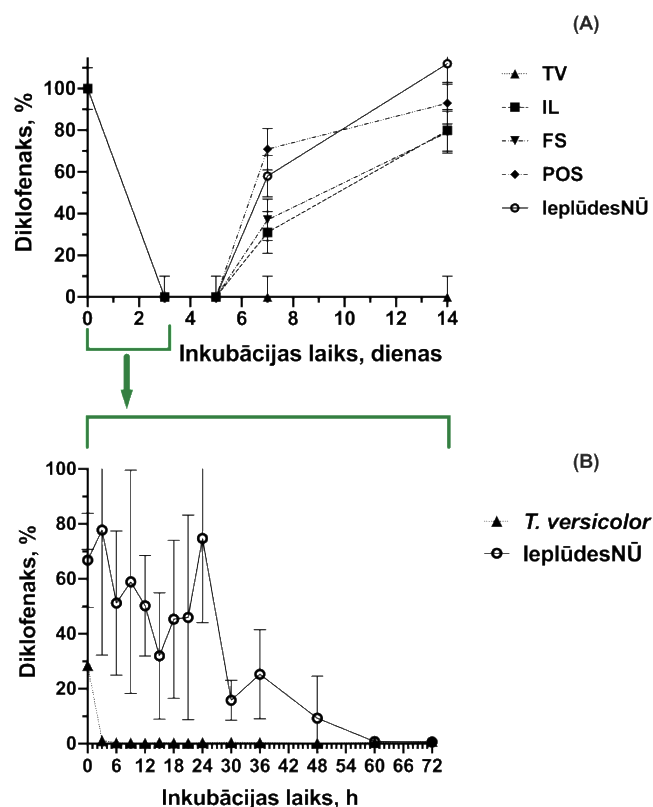
Laboratorijas eksperimenta rezultāti, kas atspoguļoti **1. publikācijā**, liecināja, ka sākotnēji izmantotā mikroskopisko sēņu pievienotā biomasas bija relatīvi zema. Tādējādi notekūdeņos esošie mikroorganismi konkurēja ar pievienotajām mikroskopiskajām sēnēm un tās nomāca. Līdz ar to sākotnējā mikroskopisko sēņu biomasas koncentrācija turpmākajos eksperimentos tika būtiski palielināta, izmantojot K1 nesējus (5. att.).

Rezultāti parādīja, ka visas izmantotās mikroskopisko sēņu kultūras pēc trīs dienu inkubācijas spēja pilnībā no notekūdeņiem attīrīt (>99,9 %) diklofenaku (6. att.). Tomēr ilgāks inkubācijas laiks izraisīja diklofenaka izdalīšanos atpakaļ notekūdeņos no visām testētajām mikroskopiskajām sēnēm, izņemot *T. versicolor* (6. B att.). Līdz ar to sēnei *T. versicolor* tika veikts biosorbcijas tests, lai noskaidrotu mehānismus, kas ietekmē diklofenaka attīrīšanas efektivitāti notekūdeņos.



5. att. Mikroskopisko sēņu augšana uz K1 nesējiem.

Biosorbcijas testa rezultāti parādīja, ka *T. versicolor* diklofenaka attīrīšanai no notekūdeņiem izmantoja gan tās lakāzes enzīma aktivitāti, gan biosorbcijas mehānismus. Lakāzes enzīma aktivitāte spēja attīrīt <20 % no kopējās pievienotās diklofenaka koncentrācijas, dzīvā biomasa – vairāk nekā 80 % no kopējās pievienotās diklofenaka koncentrācijas.



6. att. Diklofenaka attīrīšanas efektivitāte no sadzīves notekūdeņiem **(A)** pēc 14 dienu inkubācijas, izmantojot mikroskopiskās sēnes – *T. versicolor* (TV), *I. lacteus* (IL), *F. solani* (FS) un *P. ostreatus* (POS), salīdzinot ar negatīvo kontroli – sadzīves notekūdeņi bez pievienotas mikroskopisko sēņu biomasas (IeplūdesNŪ); **(B)** pēc trīs dienu inkubācijas, izmantojot *T. versicolor*, ar negatīvo kontroli – sadzīves notekūdeņi bez pievienotas mikroskopisko sēņu biomasas (IeplūdesNŪ).

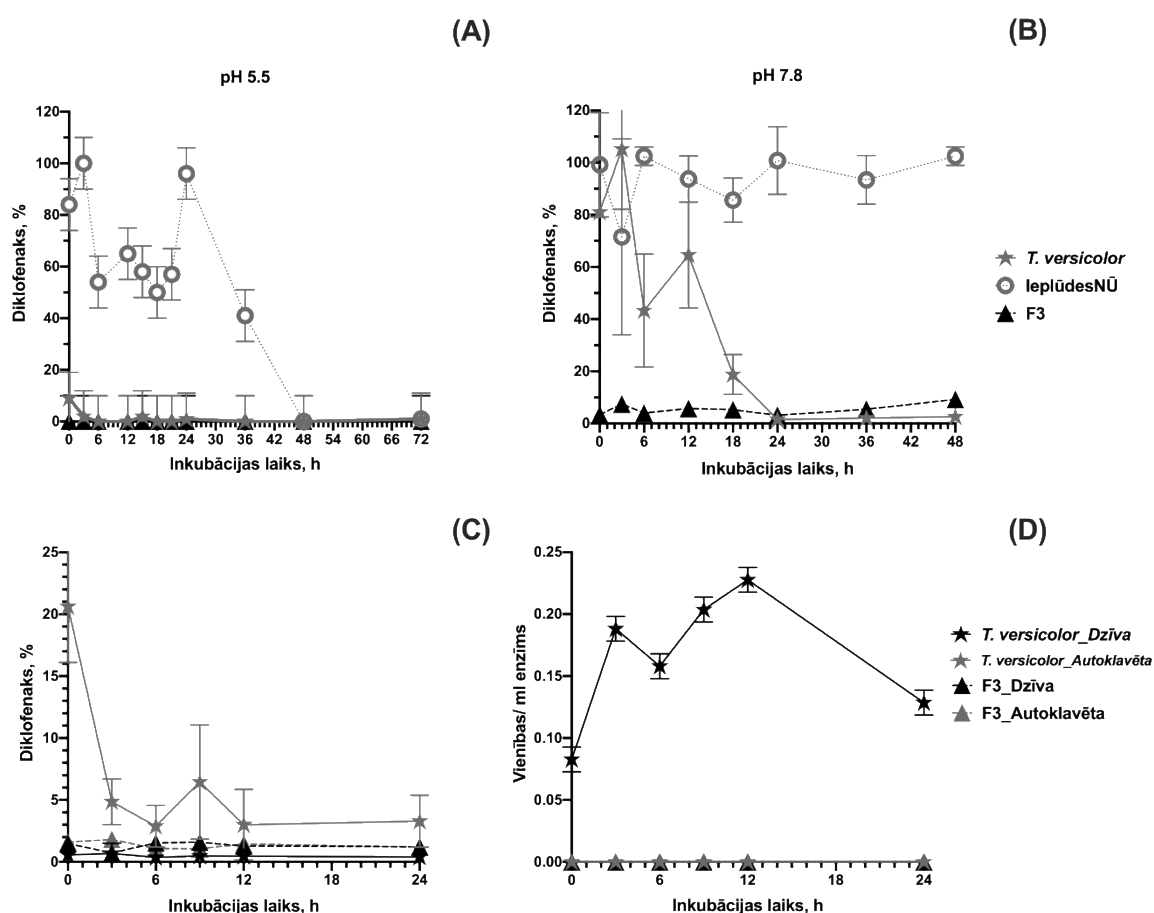
Mikroskopisko sēņu izolēšana no sadzīves notekūdeņiem

Promocijas darba **2. publikācijā** tika izmantoti sadzīves notekūdeņi, lai izolētu mikroskopiskās sēnes un noteiktu to izmantošanas iespējas notekūdeņu attīrīšanai no farmaceitiski aktīvajām vielām. Mikroskopisko sēņu izolāti tika audzēti uz agara barotnes ar tādiem farmaceitiskajiem savienojumiem kā karbamazepīns, diklofenaks, ibuprofēns un sulfametoksazols. Pamatojoties uz mikroskopisko sēņu augšanas efektivitāti, turpmākiem pētījumiem tika izmantoti septiņi sēņu izolāti. Šiem sēņu izolātiem tika pārbaudīta to spēja attīrīt sintētiskos notekūdeņus no farmaceitiski aktīvajām vielām. Lai redzētu izolātu notekūdeņu attīrīšanas efektivitātes no farmaceitiski aktīvajām vielām atšķirības, iegūtie rezultāti tika salīdzināti ar *T. versicolor*. Pētījumā tika noskaidrota arī pH ietekme uz notekūdeņu attīrīšanas no farmaceitiski aktīvajām vielām efektivitāti.

Iegūtie rezultāti **2. publikācijā** demonstrēja relatīvi zemu karbamazepīna attīrīšanas efektivitāti (<80 %). Savukārt viens no mikroskopisko sēņu izolātiem – *A. luchuensis* – uzrādīja visaugstāko attīrīšanas efektivitāti un demonstrēja spēju pilnībā (>99,9 %) attīrīt diklofenaku no sintētiskās notekūdeņu barotnes pēc sešu dienu inkubācijas pie pH 5,5. Diklofenaka samazināšanās >99,9 % pie pH 6,3 tika sasniegta pēc 10 dienu inkubācijas. Tāds

pats rezultāts tika novērots arī *T. versicolor*. Tādēļ turpmākajā darba gaitā tika pārbaudīta *T. versicolor* un *A. luchuensis* diklofenaka attīrīšanas efektivitāte, izmantojot nesterilus sadzīves notekūdeņus.

Novērtējot diklofenaka attīrīšanas efektivitāti pēc mikroskopisko sēņu pievienošanas pie dažādām pH vērtībām nesterilā sadzīves notekūdeņos, var secināt, ka *A. luchuensis* diklofenaka attīrīšanas efektivitāte pie abām pH vērtībām sasniedz >95 % (7. A, B att.). Turpretī *T. versicolor* uzrādīja relatīvi lēnāku diklofenaka attīrīšanas efektivitāti (pēc 24 h) pie pH 7,8, salīdzinot ar pH 5,5, kad diklofenaks tika pilnībā attīrīts no sadzīves notekūdeņiem (>99,9 %) pēc 3 h inkubācijas perioda. Darba gaitā tika analizēta arī lakāzes enzīma aktivitāte un veikts biosorpcijas tests *A. luchuensis*, lai labāk izprastu sakarību starp lakāzes enzīma aktivitāti, mikroskopisko sēņu biomasu un diklofenaka attīrīšanas efektivitāti (7. C, D att.).



7. att. Diklofenaka attīrīšanas efektivitāte no sadzīves notekūdeņiem (%), izmantojot mikroskopiskās sēnes *A. luchuensis* (F3) un *T. versicolor* **(A)** pie pH 5,5 un **(B)** pie pH 7,8; **(C)** sadzīves notekūdeņu attīrīšanas efektivitāte (%) biosorpcijas eksperimentā, izmantojot dzīvu un autoklavētu *A. luchuensis* (F3) un *T. versicolor* biomasu; **(D)** lakāzes aktivitāte biosorpcijas eksperimenta laikā, izmantojot dzīvu un autoklavētu *A. luchuensis* (F3) un *T. versicolor* biomasu.

Iegūtie biosorpcijas eksperimenta rezultāti liecināja, ka *A. luchuensis* neuzrāda lakāzes enzīma aktivitāti. *A. luchuensis* uzrādīja >99,9 % diklofenaka attīrīšana efektivitāti gan dzīvā,

gan autoklavētā biomasā, liecinot par to, ka diklofenaka attīrīšanas efektivitāte galvenokārt varētu būt saistīta ar biosorbcijas mehānismu.

Sadzīves notekūdeņu attīrīšana no P, NH₄-N un TOC laboratorijas mēroga eksperimentos

Īstenojot laboratorijas eksperimentus, promocijas darba **3. publikācijā** tika pētīta mikroskopisko sēņu – *T. versicolor* un *A. luchuensis* – notekūdeņu attīrīšanas efektivitāte no P, NH₄-N un TOC. Pētījumā tika noskaidrota arī pH ietekme uz P, NH₄-N un TOC attīrīšanas efektivitāti.

Laboratorijas eksperimenta rezultāti liecināja, ka abas mikroskopiskās sēnes spēj attīrīt P no nesteriliem sadzīves notekūdeņiem bez/ar pH korekciju. Rezultāti liecināja, ka *T. versicolor* spēj attīrīt NH₄-N, nemainot pH vērtību, taču NH₄-N koncentrācija palielinājās uzreiz pēc inkubācijas sākuma. Tāda pati tendence tika novērota arī *A. luchuensis*. Savukārt *T. versicolor* un *A. luchuensis* rezultāti, mainot pH līmeni, uzrādīja relatīvi nelielas NH₄-N koncentrācijas izmaiņas visā inkubācijas laikā. Tādējādi abas mikroskopiskās sēnes nerada tiešu ietekmi uz NH₄-N samazināšanos sadzīves notekūdeņos, t. i., uzskatāms, ka abas sēnes neizmantoja NH₄-N savā metabolismā, lai samazinātu NH₄-N koncentrāciju notekūdeņos. Tomēr ir nepieciešama turpmāka izpēte, lai labāk izprastu sēņu ietekmi un nozīmi uz NH₄-N līmeņa samazināšanos sadzīves notekūdeņos.

Novērtējot TOC attīrīšanas efektivitāti pēc apstrādes ar abām sēnēm, var apgalvot, ka *T. versicolor* un *A. luchuensis* var samazināt TOC koncentrāciju 72 h laikā pēc inkubācijas sākuma, mainot notekūdeņu pH līmeni. Turpretī *T. versicolor* un *A. luchuensis* rezultāti bez pH līmeņa korekcijas uzrādīja dažādas TOC koncentrācijas izmaiņas visā 72 h inkubācijas periodā. Tādējādi pH vērtības izmaiņas stabilizēja TOC attīrīšanas procesu, savukārt notekūdeņos bez pH izmaiņas tika novērotas mainīgas TOC koncentrācijas izmaiņas visā 72 h inkubācijas laikā.

Sadzīves notekūdeņu attīrīšana no P, NH₄-N un TOC pilota mēroga sistēmā

Tā kā laboratorijas eksperimentu rezultāti ar mikroskopiskajām sēnēm demonstrēja P samazināšanos un ļāva secināt, ka pH korekcija līdz 5,5 stabilizēja NH₄-N un TOC koncentrāciju samazināšanos, notekūdeņu attīrīšanas efektivitāte no P, NH₄-N un TOC tika pārbaudīta piloteksperimentā ar bioreaktoru.

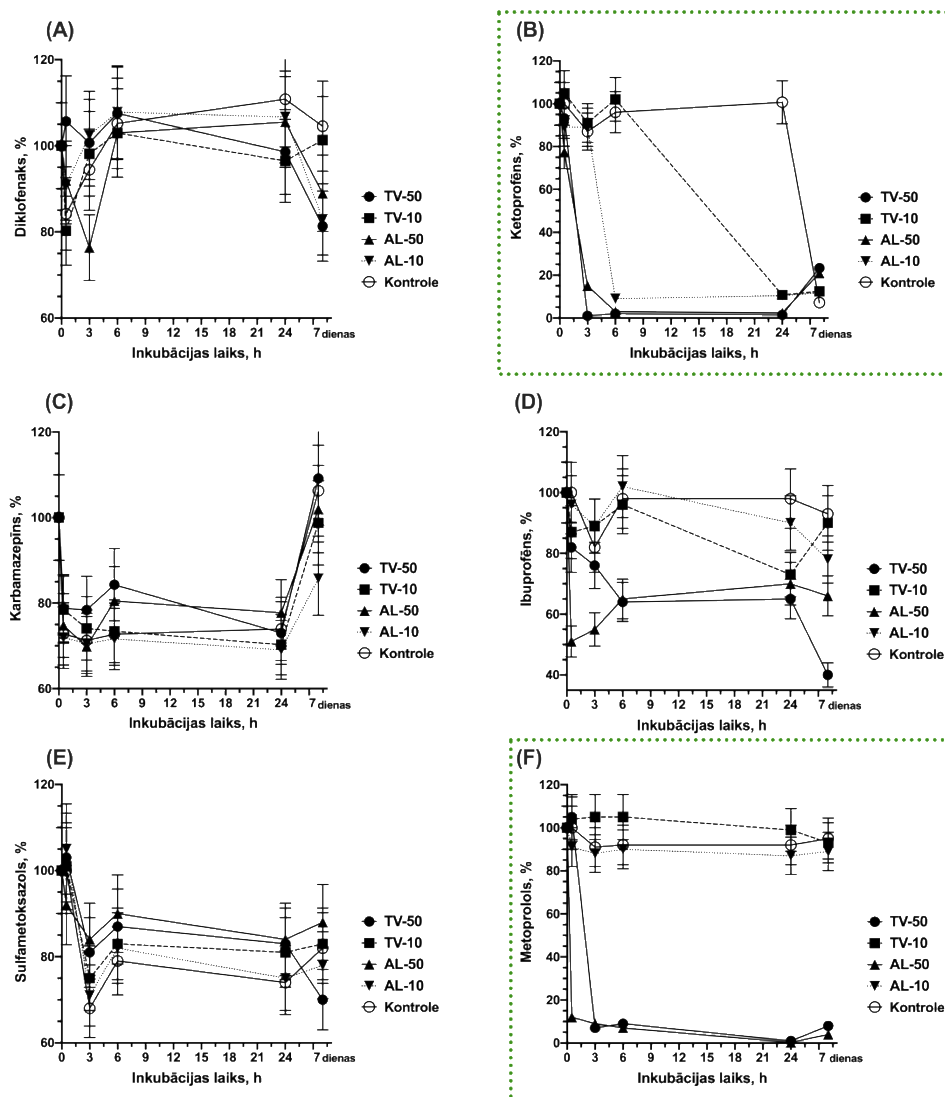
3. publikācijas par bioreaktoru ar mikroskopiskajām sēnēm rezultāti liecina bioreaktora ar mikroskopiskajām sēnēm liecina, ka abas izmantotās sēnes – *T. versicolor* un *A. luchuensis* – spēj samazināt P līmeni >80 % līdz inkubācijas perioda beigām. Savukārt NH₄-N koncentrācija nemainījās līdz inkubācijas perioda beigām. TOC rezultāti liecināja, ka TOC līmenis ir samazinājies par 35 % pēc 15 dienu inkubācijas perioda, salīdzinot ar TOC sākuma koncentrāciju.

Kopumā bioreaktora eksperimenta rezultāti, salīdzinot ar laboratorijas eksperimentu, parādīja dažādas P, NH₄-N un TOC notekūdeņu attīrīšanas tendences, izmantojot

T. versicolor un *A. luchuensis*. Tāpēc **4. publikācijā** bioreaktors tika optimizēts un tika izmantota bioaugmentācijas stratēģija, lai uzlabotu bioreaktora darbību.

Sadzīves notekūdeņu attīrīšana no farmaceitiski aktīvajām vielām pilota mēroga sistēmā

Lai labāk izprastu bioaugmentācijas ietekmi uz notekūdeņu attīrīšanas efektivitāti no farmaceitiski aktīvajām vielām, **4. publikācijā** tika optimizēts bioreaktors. Darba gaitā tika testētas divas biomasas pievienošanas stratēģijas, t. i., 10 g un 50 g. Rezultāti ar *T. versicolor* un *A. luchuensis* attīrīšanas efektivitāti diklofenakam, ketoprofēnam, karbamazepīnam, ibuprofēnam, sulfametoksazolam un metoprololam apkopoti 8. attēlā.



8. att. Bioaugmentācijas ietekme uz sadzīves notekūdeņu attīrīšanas efektivitāti (%) no farmaceitiski aktīvajām vielām (A) diklofenaka (B) ketoprofēna (C) karbamazepīna (D) ibuprofēna (E) sulfametoksazola un (F) metoprolola, izmantojot mikroskopiskās sēnes *T. versicolor* (TV) un *A. luchuensis* (AL) ar pievienoto biomasas daudzumu – 10 g un 50 g.

Abu izmantoto mikroskopisko sēņu notekūdeņu attīrīšanas efektivitātes rezultāti pēc 3 h ilga inkubācijas perioda parādīja, ka 50 g sēņu biomasas pievienošana nodrošināja relatīvi augstu (>90 %) ketoprofēna un metoprolola attīrīšanas efektivitāti (8. B, F att.), salīdzinot ar 10 g biomasas pievienošanu. Tajā pašā laikā gan *T. versicolor*, gan *A. luchuensis* ar abiem izmantotajiem biomasas pievienošanas daudzumiem uzrādīja salīdzinoši zemu (<40 %) attīrīšanas efektivitāti diklofenakam, karbamazepīnam, ibuprofēnam un sulfametoksazolam.

Mikroskopisko sēņu izmantošanas izmaksas sadzīves notekūdeņu attīrīšanā

Promocijas darba 3. un 4. publikācijā iegūtie rezultāti liecina, ka, izmantojot bioaugmentāciju, ir iespējams saglabāt pievienoto sēņu dominēšanu pār notekūdeņos esošajiem mikroorganismiem, piemēram, baktērijām, bez pH korekcijas. Ar bioaugmentācijas palīdzību ir iespējams attīrīt arī sadzīves notekūdeņus no P un farmaceitiski aktīvajām vielām, piemēram, metoprolola un ketoprofēna. Tomēr bioaugmentācijas izmantošana var radīt papildu izmaksas. Tāpēc promocijas izstrādes laikā ir veikti iespējamo mikroskopisko sēņu izmantošanai notekūdeņu attīrīšanai no farmaceitiskajām vielām izmaksu aprēķini, kas balstīti uz vidējām sadzīves notekūdeņu attīrīšanai nepieciešamajām izmaksām Eiropā (2. tab.).

2. tabula

Vidējās izmaksas dažādām sadzīves notekūdeņu attīrīšanas tehnoloģijām, salīdzinot ar bioloģisko attīrīšanu ar mikroskopiskajām sēnēm

Notekūdeņu attīrīšanas tehnoloģija	Izmaksas, EUR/m ³	Izmantotā literatūra
Bioloģiskā attīrīšana ar mikroskopiskajām sēnēm	No 200 līdz 2000	3. publikācija
Koagulācija/flotācija	No 0,35 līdz 8,5	<i>Pelendridou u. c., 2014; Yoo, 2018</i>
Membrānu tehnoloģijas	No 2	<i>Rongwong u. c., 2018</i>
Klasiskās bioloģiskās attīrīšanas	No 0,036 līdz 1	<i>Hansen u. c., 2007</i>

Līdzšinējie pētījumi (*Hansen u. c., 2007; Pelendridou u. c., 2014; Rongwong u. c., 2018; Yoo, 2018*) liecina, ka visplašāk izplatīto notekūdeņu attīrīšanas metožu, piemēram, koagulācijas/flokulācijas procesu nodrošināšanas izmaksas notekūdeņu attīrīšanai ir robežās 0,35–8,5 EUR/m³; membrānu tehnoloģiju izmantošanas izmaksas ir no 2 EUR/m³; klasiskās bioloģiskās attīrīšanas metodei tās ir 0,035–1 EUR/m³; savukārt mikroskopisko sēņu audzēšanas un ekspluatācijas izmaksas var svārstīties no 200 EUR/m³ līdz pat 2000 EUR/m³.

SECINĀJUMI

Promocijas darba mērķis bija izpētīt mikroskopisko sēņu iespējamo izmantošanu farmaceitiski aktīvo vielu attīrīšanā no sadzīves notekūdeņiem bez pH korekcijas. Lai sasniegtu šī darba mērķi, tika veikts literatūras apskats un laboratorijas vai piloteksperimenti, lai pārbaudītu mikroskopisko sēņu potenciālās izmantošanas iespējas notekūdeņu attīrīšanai no farmaceitiski aktīvajām vielām.

1. publikācijā tika noteikta ketoprofēna un diklofenaka attīrīšanas efektivitāte piecām mikroskopisko sēņu kultūrām. Eksperimenti ar sintētiskajiem notekūdeņiem parādīja, ka sēnes savstarpēji konkurē un uzrāda relatīvi augstāku ketoprofēna un diklofenaka attīrīšanas efektivitāti, ja tās tiek izmantotas individuāli. Rezultāti parādīja, ka *T. versicolor* nesterilos sadzīves notekūdeņos var sasniegt >99,9 % diklofenaka attīrīšanas efektivitāti jau pēc trīs stundu ilga inkubācijas perioda. Turklāt *T. versicolor* parādīja gan lakāzes enzīma aktivitāti, gan biosorbciju diklofenaka attīrīšanai no sadzīves notekūdeņiem. Tāpēc *T. versicolor* tika turpmāk izmantota **2., 3. un 4. publikācijā**.

2. publikācijā rezultāti parādīja, ka sēņu izolātam no sadzīves notekūdeņiem *A. luchuensis* piemīt visaugstākā notekūdeņu attīrīšanas efektivitāte no farmaceitiski aktīvajām vielām, salīdzinot ar pārējiem izolātiem. Turklāt *A. lucuensis* attīrīja notekūdeņus no farmaceitiskām vielām bez pH korekcijas, salīdzinot ar *T. versicolor*. Pateicoties mazāk specifiskām pH prasībām, *A. luchuensis* piemīt relatīvi augstāks izmantošanas potenciāls sadzīves notekūdeņu attīrīšanā, salīdzinot ar *T. versicolor*. Tāpēc tālāk **3. un 4. publikācijā** tika izvēlētas šīs divas mikroskopiskās sēņu kultūras, un tās tika testētas izveidotajā bioreaktorā.

3. publikācijā tika izveidots bioreaktors un pārbaudīta P, NH₄-N un TOC attīrīšanas efektivitāte. Šī pētījuma laikā tika demonstrēts, ka mikroskopiskās sēnēs spēj attīrīt P no sadzīves notekūdeņiem laboratorijas eksperimentā, taču bioreaktora eksperimenta rezultāti neuzrādīja būtisku P koncentrāciju samazināšanos. Tāpēc **4. publikācijā** bioreaktors tika optimizēts un tika izmantota bioaugmentācijas stratēģija, lai pievienotu sēņu biomasu.

4. publikācijas rezultāti demonstrēja, ka bioaugmentācija ar mikroskopiskajām sēnēm varētu būt piemērota stratēģija bioreaktora darbības optimizācijai un izmantošanai notekūdeņu attīrīšanā no farmaceitiski aktīvajām vielām.

Mikroskopisko sēņu izmantošanas notekūdeņu attīrīšanā no farmaceitiskajām vielām izmaksas lielā mērā ir atkarīgas no prasībām un apstākļiem, kas nepieciešami mikroskopisko sēņu audzēšanai (temperatūras, inkubācijas laika, maisīšanas, barotnes sastāva). Tādējādi mikroskopisko sēņu izmantošanas izmaksas šobrīd ir vienas no augstākajām, kas minētas zinātniskajā literatūrā. Tomēr notekūdeņu attīrīšanai no farmaceitiskajām vielām ar mikroskopiskajām sēnēm joprojām piemīt relatīvi augsts izmantošanas potenciāls, nākotnē kļūstot par videi draudzīgu un ilgtspējīgu notekūdeņu attīrīšanas metodi (*Mir-Tutusa* u. c., 2018). Turklāt mikroskopisko sēņu izmantošana var sniegt vērtīgas priekšrocības ilgtermiņā, piemēram, iegūstot jaunus produktus no notekūdeņu attīrīšanā izmantotās sēņu biomasas. Tādējādi var tikt samazinātas arī kopējās izmaksas, kas nepieciešamas notekūdeņu attīrīšanas ar mikroskopiskajām sēnēm procesu nodrošināšanai (*Sankaran* u. c., 2010).

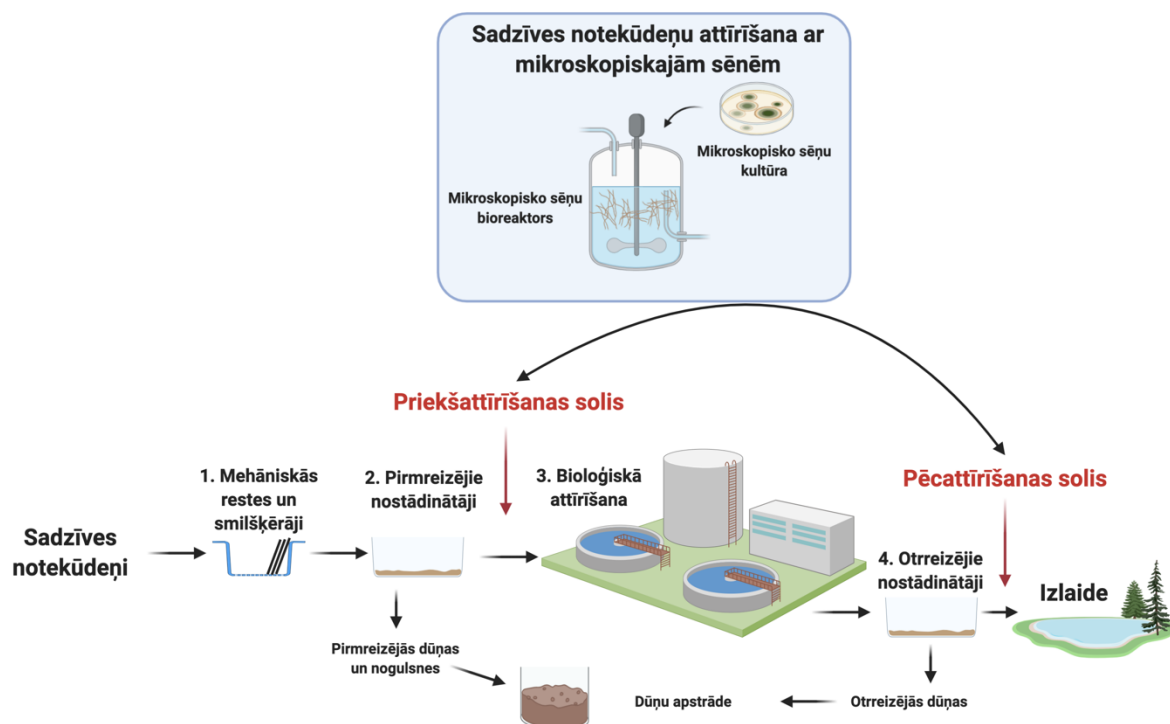
Rekomendācijas un turpmākie pētījumi

Viens no būtiskākajiem mikroskopisko sēņu metodes izmantošanas ieguvumiem ir bioloģisko procesu izmantošana notekūdeņu attīrīšanas nodrošināšanā, tādējādi nav nepieciešama papildu ķīmisko vielu un reaģentu lietošana (Pointing, 2001). Promocijas darba rezultāti liecina, ka mikroskopisko sēņu izmantošana notekūdeņu attīrīšanas iekārtās varētu tikt izmantota kā sadzīves notekūdeņu priekšattīrīšanas vai pēcatattīrīšanas posms (9. att.). Tomēr iegūtie rezultāti parādīja, ka mikroskopisko sēņu augšana nesterilos apstākļos jeb reālos notekūdeņos ir ierobežota, līdz ar to notekūdeņu attīrīšanas efektivitāte no farmaceitiski aktīvajām vielām samazinās, salīdzinot ar laboratorijas eksperimentu rezultātiem.

Iepriekšējie pētījumi liecina, ka notekūdeņu sterilizēšana nav rentabla un piemērota ieviešanai reālos apstākļos, lai uzlabotu notekūdeņu attīrīšanas efektivitāti no farmaceitiski aktīvām vielām ar mikroskopiskajām sēnēm (Espinosa-Ortiz u. c., 2016; Ferreira u. c., 2020; Mir-Tutusauss u. c., 2019). Tāpēc turpmākajos pētījumos nepieciešams turpināt pētīt mijiedarbību starp sēnēm un baktērijām (Muradov u. c., 2015; Wei u. c., 2018). Nepieciešami turpmāki pētījumi, lai detalizēti izprastu piedāvātās metodes ekspluatācijas izaicinājumus un prasības reālās notekūdeņu attīrīšanas iekārtās (Mir-Tutusauss u. c., 2018). **4. publikācijā** sēņu bioreaktorā tika pievienots salīdzinoši augsts sēņu biomasas daudzums. Eksperimentu laikā netika veikta biomasas atsūkņēšana no bioreaktora, līdz ar to pievienotā biomasa inkubācijas laikā uzkrājās bioreaktorā, tādējādi, iespējams, kavējot sēņu adaptāciju un augšanu bioreaktorā. Turpmākajos eksperimentos bioreaktorā nepieciešams optimizēt biomasas atdalīšanas un atsūkņēšanas mehānismus. Turklāt *T. versicolor* un *A. luchuensis* ir sporu veidojoši mikroorganismi (Benson u. c., 2019; Hong u. c., 2013). Līdz ar to ir jāizstrādā stratēģija, kā nodrošināt sporu izdalīšanu no bioreaktora un sēņu biomasas izmantošanu pēc notekūdeņu attīrīšanas (Sankaran u. c., 2010).

Promocijas darba izstrādes gaitā tika konstatēts, ka mikroskopiskās sēnes farmaceitisko vielu attīrīšanai var izmantot divus mehānismus – enzīmu aktivitāti un biosorbciiju. Sēnes farmaceitisko vielu attīrīšanai var izmantot arī biosorbciiju, tāpēc izmantotā biomasa var saturēt relatīvi augstu koncentrāciju ar farmaceitiski aktīvo vielu savienojumiem (Jureczko, 2018), kas vēl jo vairāk izgaismo nepieciešamību izstrādāt izmantotās biomasas apsaimniekošanas stratēģiju.

Šobrīd notekūdeņu attīrīšana ar mikroskopiskajām sēnēm netiek izmantota. Pēc pētnieka Mir-Tutusauss domām, apstrādes ar sēnēm ilgtspējīga attīstība ir atkarīga no vairāku trūkumu novēršanas: (1) nepieciešams ilgstoši uzturēt stabilu mikroskopisko sēņu augšanas aktivitāti; (2) saglabāt relatīvi augstu notekūdeņu attīrīšanas efektivitāti nesterilos apstākļos (Mir-Tutusauss u. c., 2019). Lai šī metode kļūtu konkurētspējīga ar citām alternatīvajām notekūdeņu attīrīšanas metodēm, nepieciešams samazināt sēņu izmantošanai nepieciešamo apstākļu (temperatūra, inkubācijas laiks, barotnes sastāvs) nodrošināšanas izmaksas (Mir-Tutusauss u. c., 2018; Sankaran u. c., 2010).



9. att. Mikroskopisko sēņu metodes iespējamā iekļaušana klasiskā sadzīves notekūdeņu attīrīšanas principiālajā shēmā (izveidots ar *BioRender.com*).

Promocijas darba rezultāti apstiprina zinātnisko jautājumu, t. i., mikroskopiskās sēnes spēj attīrīt sadzīves notekūdeņus no farmaceutiski aktīvajām vielām. Iegūtie darba rezultāti sniedz būtiskas un noderīgas zināšanas un novērojumus turpmākajiem pētījumiem. Piemēram, sinerģiskā pētījuma izpēte **1. publikācijā** parādīja, ka sēnēm ir salīdzinoši augstāka farmaceutisko vielu atdalīšanas efektivitāte, ja tās inkubē atsevišķi, nevis izmanto jauktas sēņu kultūras. Šī pētījuma rezultāti sniedz ieskatu arī par to, kā labāk izprast sēņu notekūdeņu attīrīšanas efektivitāti no farmaceutiski aktīvajām vielām.

DARBA APROBĀCIJA

Publikācijas

1. Dalecka B., Juhna T. Rajarao G. K. Constructive use of filamentous fungi to remove pharmaceutical substances from wastewater. *Journal of Water Process Engineering*, 33, 2020.
2. Dalecka B., Oskarsson C., Juhna T. Rajarao G. K. Isolation of fungal strains from municipal wastewater for the removal of pharmaceutical substances. *Water*, 12, 524, 2020.
3. Dalecka B., Strods M., Rajarao G. K., Juhna T. Removal of total phosphorus, ammonia nitrogen and organic carbon from non-sterile municipal wastewater with *Trametes versicolor* and *Aspergillus luchuensis*. *Microbiological Research*, 241, 2020.
4. Dalecka B., Strods M., Cacivkins P., Ziverte E., Rajarao G. K., Juhna T. Bioaugmentation with fungi: An emerging strategy for removing pharmaceutical substances in wastewater treatment process by fluidized bed pelleted bioreactor. *Chemosphere*, 2021 (izstrādes procesā).

Konferences

1. Rīgas Tehniskās universitātes 61. starptautiskā zinātniskā konference, Latvija, 16.10.2020. Dalība ar prezentāciju "Filamentous fungi: a promising approach for nutrient removal from municipal wastewater".
2. Rīgas Tehniskās universitātes 60. starptautiskā zinātniskā konference, Latvija, 16.10.2019. Dalība ar prezentāciju "Wastewater treatment from hazardous substances by filamentous fungi".
3. IWA 11th Eastern European Young Water Professionals conference, Čehija, 1.–5.10.2019. Dalība ar prezentāciju un pagarināto abstraktu "Potential use of filamentous fungi for diclofenac removal from municipal wastewater". Balva par labāko prezentāciju.
4. IWA 9th International Young Water Professionals conference, Kanāda, 23.–27.06.2019. Dalība ar prezentāciju un pagarināto abstraktu "Isolation fungal strains from municipal wastewater for their use in pharmaceutical substances removal".
5. IWA 10th Eastern European Young Water Professionals conference, Horvātija, 7.–15.05.2018. Dalība ar prezentāciju un pagarināto abstraktu "Simple screening of fungal strains to determine potential application for the wastewater treatment process".
6. IWA 9th Eastern European Young Water Professionals conference, Ungārija, 24.–27.05.2017. Dalība ar prezentāciju un pagarināto abstraktu "Study of potential PCR inhibitors in drinking water from riga distribution system".
7. Rīgas Tehniskās universitātes 58. starptautiskā zinātniskā konference, Latvija, 16.10.2017. Dalība ar prezentāciju "Production and use of bioenergy in wastewater treatment plants: opportunities and perspectives".

LITERATŪRA

- Baresel, C., Cousins, A. P., Ek, M., Ejhed, H., Allard, A., Magnér, J., Westling, K., Fortkamp, U., Wahlberg, C., Hörsing, M., Söhr, S., 2015. Pharmaceutical residues and other emerging substances in the effluent of sewage treatment plants. *Swedish Environ. Res. Inst.* B2226.
- Benson, K. F., Stamets, P., Davis, R., Nally, R., Taylor, A., Slater, S., Jensen, G. S., 2019. The mycelium of the *Trametes versicolor* (Turkey tail) mushroom and its fermented substrate each show potent and complementary immune activating properties in vitro. *BMC Complement. Altern. Med.* 19, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2681-7>
- Besha, A. T., Gebreyohannes, A. Y., Tufa, R. A., Bekele, D. N., Curcio, E., Giorno, L., 2017. Removal of emerging micropollutants by activated sludge process and membrane bioreactors and the effects of micropollutants on membrane fouling: A review. *J. Environ. Chem. Eng.* 5, 2395–2414. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.04.027>
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M., Llopart, M., García-Jares, C., Rodríguez, I., Gómez, M., Ternes, T., 2004. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Res.* 38, 2918–2926. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.03.029>
- Cruz-Morató, C., Ferrando-Climent, L., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., Marco-Urrea, E., Vicent, T., Sarrà, M., 2013. Degradation of pharmaceuticals in non-sterile urban wastewater by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor. *Water Res.* 47, 5200–5210. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.007>
- Espinosa-Ortiz, E. J., Rene, E. R., Pakshirajan, K., van Hullebusch, E. D., Lens, P. N. L., 2016. Fungal pelleted reactors in wastewater treatment: Applications and perspectives. *Chem. Eng. J.* 283, 553–571. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.07.068>
- Ferreira, J. A., Varjani, S., Taherzadeh, M. J., 2020. A Critical Review on the Ubiquitous Role of Filamentous Fungi in Pollution Mitigation. *Curr. Pollut. Reports.* <https://doi.org/10.1007/s40726-020-00156-2>
- Hansen, R., Thøgersen, T., Rogalla, F., 2007. Comparing cost and process performance of activated sludge (AS) and biological aerated filters (BAF) over ten years of full scale operation. *Water Sci. Technol.* 55, 99–106. <https://doi.org/10.2166/wst.2007.247>
- Hong, S. B., Lee, M., Kim, D. H., Varga, J., Frisvad, J. C., Perrone, G., Gomi, K., Yamada, O., Machida, M., Houbraken, J., Samson, R. A., 2013. *Aspergillus luchuensis*, an Industrially Important Black *Aspergillus* in East Asia. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063769>
- Jureczko, M., 2018. *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor*, Fungal Strains as Remedy for Recalcitrant Pharmaceuticals Removal Current Knowledge and Future Perspectives. *Biomed. J. Sci. Tech. Res.* 3, 1–6. <https://doi.org/10.26717/bjstr.2018.03.000903>
- Kramer, R. D., Filipe, T. C., Prado, M. R., de Azevedo, J. C. R., 2018. The influence of solid-liquid coefficient in the fate of pharmaceuticals and personal care products in aerobic wastewater treatment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 25515–25525. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2609-7>

- Lu, T., Zhang, Q.-L., Yao, S.-J., 2016. Application of Biosorption and Biodegradation Functions of Fungi in Wastewater and Sludge Treatment 65–90. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42852-9_4
- Margot, J., Rossi, L., Barry, D. A., Holliger, C., 2015. A review of the fate of micropollutants in wastewater treatment plants. *Wiley Interdiscip. Rev. Water* 2, 457–487. <https://doi.org/10.1002/wat2.1090>
- Martín, J., Camacho-Muñoz, D., Santos, J. L., Aparicio, I., Alonso, E., 2012. Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: Removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal. *J. Hazard. Mater.* 239–240, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.068>
- Maurer, M., Escher, B. I., Richle, P., Schaffner, C., Alder, A. C., 2007. Elimination of β -blockers in sewage treatment plants. *Water Res.* 41, 1614–1622. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.01.004>
- Mir-Tutusaus, J. A., Baccar, R., Caminal, G., Sarrà, M., 2018. Can white-rot fungi be a real wastewater treatment alternative for organic micropollutants removal? A review. *Water Res.* 138, 137–151. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.056>
- Mir-Tutusaus, J. A., Parladé, E., Villagrasa, M., Barceló, D., Rodríguez-Mozaz, S., Martínez-Alonso, M., Gaju, N., Sarrà, M., Caminal, G., 2019. Long-term continuous treatment of non-sterile real hospital wastewater by *Trametes versicolor*. *J. Biol. Eng.* 13. <https://doi.org/10.1186/s13036-019-0179-y>
- Muradov, N., Taha, M., Miranda, A. F., Wrede, D., Kadali, K., Gujar, A., Stevenson, T., Ball, A. S., Mouradov, A., 2015. Fungal-assisted algal flocculation: Application in wastewater treatment and biofuel production. *Biotechnol. Biofuels* 8. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0210-6>
- Pelendridou, K., Michailides, M. K., Zagklis, D. P., Tekerlekopoulou, A. G., Paraskeva, C. A., Vayenas, D. V., 2014. Treatment of olive mill wastewater using a coagulation-flocculation process either as a single step or as post-treatment after aerobic biological treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89, 1866–1874. <https://doi.org/10.1002/jctb.4269>
- Pointing, S. B., 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 20–33. <https://doi.org/10.1007/s002530100745>
- Rongwong, W., Lee, J., Goh, K., Karahan, H. E., Bae, T.-H., 2018. Membrane-based technologies for post-treatment of anaerobic effluents. *npj Clean Water* 1. <https://doi.org/10.1038/s41545-018-0021-y>
- Sankaran, S., Khanal, S. K., Jasti, N., Jin, B., Pometto, A. L., Van Leeuwen, J. H., 2010. Use of filamentous fungi for wastewater treatment and production of high value fungal byproducts: A review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 40, 400–449. <https://doi.org/10.1080/10643380802278943>
- Taheran, M., Brar, S. K., Verma, M., Surampalli, R. Y., Zhang, T. C., Valero, J. R., 2016. Membrane processes for removal of pharmaceutically active compounds (PhACs) from water and wastewaters. *Sci. Total Environ.* 547, 60–77. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.139>

- Ternes, T. A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* 32, 3245–3260. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00099-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00099-2)
- Wang, J., Wang, S., 2016. Removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) from wastewater: A review. *J. Environ. Manage.* 182, 620–640. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.07.049>
- Wei, Z., Liu, Y., Feng, K., Li, S., Wang, S., Jin, D., Zhang, Y., Chen, H., Yin, H., Xu, M., Deng, Y., 2018. The divergence between fungal and bacterial communities in seasonal and spatial variations of wastewater treatment plants. *Sci. Total Environ.* 628–629, 969–978. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.003>
- Yamashita, T., Yamamoto-Ikemoto, R., 2014. Nitrogen and phosphorus removal from wastewater treatment plant effluent via bacterial sulfate reduction in an anoxic bioreactor packed with wood and iron. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 11, 9835–9853. <https://doi.org/10.3390/ijerph110909835>
- Yoo, S. S., 2018. Operating cost reduction of in-line coagulation/ultrafiltration membrane process attributed to coagulation condition optimization for irreversible fouling control. *Water* 10. <https://doi.org/10.3390/w10081076>
- Zahmatkesh, M., Spanjers, H., van Lier, J. B., 2017. Fungal treatment of humic-rich industrial wastewater: application of white rot fungi in remediation of food-processing wastewater. *Environ. Technol.* 38, 2752–2762. <https://doi.org/10.1080/09593330.2016.1276969>