

Lublin, dn. 27.04.2023 r.

dr hab. inż. Michał Marzec, prof. UP
Katedra Inżynierii Środowiska i Geodezji
Wydział Inżynierii Produkcji
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **mgr inż. Kamili Hamal**
pt.: **”Immobilizacja bakterii anammox na agrowłókninach”**
wykonanej na Wydziale Inżynierii Kształtowania Środowiska i Geodezji
Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu
pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Janusza Łomotowskiego,
promotor pomocniczy: dr inż. Magdalena Domańska

1. Podstawa opracowania recenzji

Recenzję opracowano na podstawie uchwały Rady Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 8 lutego 2023 roku oraz umowy o dzieło nr ewid. UCP/2023/02/01/43/Z.

2. Podstawowe informacje o ocenianej rozprawie doktorskiej

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w formie monografii naukowej. Liczy łącznie 259 stron. Zawiera 116 rysunków (schematy, wykresy, fotografie) i 59 tabel. Praca została podzielona na 7 głównych rozdziałów oraz wykaz piśmiennictwa. Wykaz źródeł wykorzystanych w rozprawie obejmuje 562 pozycje.

3. Ocena formalna rozprawy doktorskiej

Rozprawa ma klasyczną konstrukcję, na którą składa się krótkie wprowadzenie, dwa rozdziały przeglądowe, cele i hipotezy badawcze, opis prac eksperymentalnych i metodyka prowadzonych badań oraz omówienie wyników badań z ich dyskusją i wnioski końcowe. Przyjęty układ i podział treści na rozdziały jest logiczny. Pozwolił Autorce na zarysowanie problematyki badawczej, będącej tematem rozprawy, wskazanie luk w zakresie wiedzy i praktyki, co było niezbędne do sformułowania celów rozprawy i hipotezy badawczej, a następnie omówienie wyników badań, służących jej weryfikacji.

Nasuwa się tu drobna uwaga dotycząca wtórnej hipotezy badawczej, którą Autorka sformułowała w rozdziale metodycznym (strona 118). Wydaje się, że powinna się ona znaleźć w rozdziale 4, który jest temu poświęcony.

Rozprawa jest bardzo obszerna, co wynika z zakresu prowadzonych prac badawczych i eksperymentalnych, niemniej jednak można postawić pytanie, czy nie było by korzystne ograniczenie jej objętości. W tym kontekście warto zwrócić uwagę na bardzo rozbudowane rozdziały przeglądowe, liczące aż 89 stron. Należy w tym miejscu nadmienić, że jest to bardzo interesująca lektura, obejmująca analizę procesów i technologii oczyszczania ścieków, w tym wykorzystania bakterii anammox, również w ujęciu historycznym. Ta część rozprawy jest bardzo dobrze udokumentowana i niewątpliwie wymagała od Autorki ogromnego nakładu pracy. Świadczy także o doskonałym przygotowaniu merytorycznym Autorki, jednakże z punktu widzenia tematu rozprawy można było niektóre z zagadnień pominąć lub przedstawić w bardziej syntetycznej formie.

Język rozprawy jest z reguły jasny i zwięzły, pozwala ze zrozumieniem śledzić wywody Autorki, co warto docenić, uwzględniając ogromny zasób prezentowanych danych, jak również bardzo złożony schemat prac eksperymentalnych. Autorka niestety nie uniknęła w tekście licznych błędów gramatycznych, leksykalnych i interpunkcyjnych. Stanowią one mankament pracy, jednak nie utrudniają zrozumienia sensu przekazywanych treści. Odsyłacze do elementów towarzyszących, jak tabele i rysunki są stosowane właściwie, tylko sporadycznie zdarzają się błędy w tym zakresie (np. strona 203 – powinno być odniesienie do tabeli 50).

Niezbyt korzystnie na formę opracowania i jego czytelność wpływa dzielenie tabel (np. tabela 8, 9, 12, 48), ewentualnie umieszczanie tabel i rysunków oraz ich tytułów na dwóch różnych stronach (np. tabela 7, rysunek 58, 91).

Wszystkie elementy graficzne zostały w rozprawie zakwalifikowane jako „rysunki”, tymczasem są wśród nich również fotografie (co często jest sugerowane przez Autorkę w tytule), dlatego być może bardziej trafne było by stosowanie określenia „rycina”.

Pomimo pewnych niedociągnięć przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest w mojej ocenie kompletna i spełnia wymogi formalne określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2017, poz. 1789).

4. Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Głównym celem badań omówionych w rozprawie doktorskiej jest ocena możliwości trwałej immobilizacji bakterii anammox na mobilnych modułach wykonanych na bazie agrowłóknin. Obszar związany z wykorzystaniem bakterii anammox w oczyszczaniu ścieków w ostatnich latach rozwija się bardzo intensywnie, co związane jest z ich cechami. Dzięki specyficznym szlakom metabolicznym bakterie anammox umożliwiają oczyszczanie ścieków,

charakteryzujących się bardzo wysokimi stężeniami azotu amonowego. W porównaniu z innymi procesami usuwania azotu, proces anammox wykazuje się niższą produkcją osadu oraz mniejszym zapotrzebowaniem na tlen i źródła węgla organicznego. Dzięki temu wykorzystanie bakterii anammox może mieć istotne znaczenie z punktu widzenia efektywności ekonomicznej i dążenia do uzyskania samowystarczalności energetycznej oczyszczalni ścieków. Przesłanką do podjęcia przez Autorkę badań była dogłębna analiza dotychczasowych doświadczeń w zakresie wykorzystania bakterii anammox w komunalnych oczyszczalniach ścieków, w tym głównie do oczyszczania odcieków, powstających w procesie fermentacji osadów. Wynika z nich m.in., że głównym czynnikiem ograniczającym wykorzystanie bakterii anammox w ciągach technologicznych oczyszczalni ścieków, szczególnie w warunkach klimatu umiarkowanego może być niższa temperatura ścieków. Z kolei szansą na neutralizację tych ograniczeń jest immobilizacja biomasy bakterii na trwałych nośnikach i przenoszenie jej w tej formie do urządzeń oczyszczania ścieków. W tym aspekcie badania podjęte przez mgr inż. Kamilę Hamal uważam za w pełni uzasadnione i bardzo cenne z punktu widzenia rozwoju nowoczesnych metod oczyszczania ścieków.

Na potrzeby weryfikacji hipotezy głównej Autorka sformułowała trzy szczegółowe problemy badawcze w formie pytań: jakie czynniki determinują rozwój bakterii anammox na nośnikach z agrowłóknin w czasie ich aktywacji, jak konstrukcja nośnika i czas jego aktywacji wpływa na początkową sprawność technologiczną usuwania azotu mineralnego oraz, czy zamrażanie kultur bakterii anammox wpływa na ich aktywność biochemiczną? Dodatkowo weryfikowano poboczną hipotezę badawczą, mówiącą, że wprowadzenie pomiędzy warstwy agrowłókniny materiału hydrofilowego (łatwo zwilżalnego) w postaci tkaniny lnianej wpływa na rozwój bakterii anammox wewnątrz nośnika.

Realizacja założonych celów obejmowała prace eksperymentalne z wykorzystaniem nośników w postaci specjalnie przygotowanych modułów, których zasadniczym elementem były warstwy agrowłókniny nawinięte na perforowane rury z PCV i PE. Schemat 5-letnich badań był bardzo złożony, lecz dobrze przemyślany i adekwatny do weryfikacji hipotez badawczych. Moduły poddawano aktywacji poprzez namywanie osadu zawierającego bakterie anammox. Moduły różniły się między sobą zarówno pod względem konstrukcji (średnica i długość, ilość agrowłókniny, perforacja rur stanowiących szkielet modułów), jak i czasu aktywacji. Po aktywacji moduły wykorzystano do przeprowadzenia szeregu prac badawczych i eksperymentalnych, pozwalających określić wpływ konstrukcji modułów, czasu aktywacji i różnych warunków technologicznych na skład zbiorowisk bakterii, w tym rozwój bakterii anammox na nośnikach oraz szybkość ubytku azotu mineralnego jako miarę ich aktywności

biochemicznej. Zwraca uwagę bardzo szeroki zakres i wielopoziomowość zrealizowanych badań. Pod względem metodycznym prace eksperymentalne i analityczne zrealizowano poprawnie. W odniesieniu do właściwości fizycznych i chemicznych pożywek i ścieków wykorzystywano, zgodnie z obowiązującymi normami oznaczenia analityczne oraz przyjęte modele matematyczne. Na szczególną uwagę zasługuje fakt wykorzystania w badaniach metod analizy składu zbiorowisk bakterii i ich identyfikacji, w tym metody FISH, LIVE/DEAD®, PCR z sekwencjonowaniem nowej generacji (NGS), czy statystycznej analizy obrazu i badań składu granulometrycznego osadów. Umiejętność zastosowania tak zaawansowanych metod badawczych oraz właściwej interpretacji ich wyników świadczy o wszechstronnym przygotowaniu merytorycznym Autorki w zakresie oczyszczania ścieków i biotechnologii.

Realizacja poszczególnych etapów eksperymentów pozwoliła Autorce odpowiedzieć na kluczowe pytania związane z mechanizmem immobilizacji bakterii anammox na materiale porowatym i możliwością ich wykorzystania w urządzeniach do oczyszczania ścieków.

Na etapie aktywacji nośników, analiza wielkości porów i składu granulometrycznego zatrzymanych na nośnikach osadów wskazała na przyspieszone tworzenie placka filtracyjnego na zewnętrznych powłokach agrowłóknin oraz powstawanie uprzywilejowanych dróg filtracji, ściśle związanych porowatością agrowłókniny. Badania udziałów poszczególnych gromad bakterii wykazały z kolei, że wydłużanie czasu aktywacji może wpływać na zanik bakterii anammox, co uzasadniono zmniejszeniem dostępności substratów dla bakterii immobilizowanych w głębszych warstwach agrowłóknin oraz wewnątrz placka filtracyjnego na warstwie powierzchniowej.

Po aktywacji, wycinki materiału porowatego z immobilizowaną biomasa bakterii anammox wykorzystywano m.in. w procesie filtracji grawitacyjnej pożywki mineralnej. Eksperyment z wykorzystaniem dwóch modułów o identycznej konstrukcji wykazał dodatnią zależność pomiędzy czasem aktywacji nośników a godzinową szybkością usuwania azotu mineralnego z pożywki. W obydwu przypadkach szybkość ubytku azotu mineralnego spadała wraz z upływem czasu. W miarę upływu czasu zmianie ulegała również struktura form azotu mineralnego w pożywce, wzrastał udział azotu azotanowego przy spadku azotu amonowego i azotynowego.

Eksploatacja aktywowanych nośników z kulturami bakterii anammox w reaktorach z pożywką mineralną wykazały możliwy wpływ temperatury, tlenu rozpuszczonego i odczynu na szybkości ubytku azotu mineralnego i powierzchniowe szybkości usuwania ładunku azotu mineralnego traktowane jako miary aktywności bakterii anammox. Jednocześnie, wykorzystując zmodyfikowane pożywki mineralne oparte na azocie azotynowym stwierdzono,

że w warunkach prowadzenia prac eksperymentalnych szybkość ubytku azotu mineralnego nie może być traktowana jako miara aktywności bakterii anammox, gdyż jest wypadkową aktywności również innych gatunków bakterii, w tym proteolitycznych, nityfikacyjnych i denitryfikacyjnych.

Badania potwierdziły istnienie zależności pomiędzy czasem immobilizacji bakterii na agrowłókninach a odczynem pożywek, w których eksploatowane były nośniki. Stwierdzono alkalizację środowiska w przypadku nośnika o dłuższym czasie aktywacji, która to alkalizacja jest wiązana z większą aktywnością bakterii anammox. W efekcie przeprowadzonych badań stwierdzono również, że istotne znaczenie dla szybkości usuwania azotu mineralnego może mieć konstrukcja modułów opartych na agrowłókninach, w tym perforacja rur stanowiących ich szkielet. Stwierdzono, że wpływ ten był większy aniżeli wpływ czasu aktywacji modułów.

Zgodnie z wynikami badań zamrażanie kultur bakterii immobilizowanych na nośniku nie destabilizuje składu i nie obniża aktywności immobilizowanych zbiorowisk bakteryjnych.

Na jednym z etapów badań analizowano efekty eksploatacji modułów przy zmiennych stężeniach form azotu mineralnego po dwóch stronach materiału porowatego (wewnątrz i na zewnątrz modułu). Wyniki tego eksperymentu wydają się szczególnie istotne w kontekście ich wykorzystania przy projektowaniu układów technologicznych oczyszczania ścieków z systemem recyrkulacji wewnętrznej, w których strumienie ścieków surowych i recyrkulowanych istotnie różnią się pod względem zawartości mineralnych form azotu. Konstrukcja modułów pozwala na rozłączne skierowanie każdego z tych strumieni na zewnątrz i do wewnątrz modułu. Zgodnie z wynikami badań, w warunkach technicznych możliwa jest eksploatacja modułów przy wysokim stężeniu azotu amonowego na zewnątrz i azotu azotynowego wewnątrz modułu.

Na końcowym etapie badań pozytywnie zweryfikowano wtórną hipotezę badawczą o pozytywnym wpływie na rozwój bakterii anammox materiału hydrofilowego w postaci tkaniny lnianej, wprowadzonego pomiędzy warstwy agrowłókniny.

Uwzględniając opisane powyżej wyniki badań i wnioski szczegółowe z nich wynikające można zdefiniować główne osiągnięcia recenzowanej rozprawy doktorskiej. Należą do nich przede wszystkim:

- potwierdzenie tezy o możliwości trwałej immobilizacji kultur bakterii anammox na agrowłókninach oraz przenoszenia biomasy w takiej formie z miejsc immobilizacji do urządzeń technologicznych oczyszczania ścieków;
- rozpoznanie mechanizmów zasiedlania nośników opartych na agrowłókninach przez mikroorganizmy, w tym bakterie anammox;

- identyfikacja głównych czynników determinujących rozwój bakterii anammox w trakcie aktywacji nośników wykonanych na bazie agrowłóknin;
- wykazanie, że zamrażanie kultur bakterii anammox nie powoduje zaniku ich aktywności biologicznej i po rozmrożeniu możliwe jest ich efektywne wykorzystanie;
- określenie warunków eksploatacji uaktywnionych nośników z biomasą bakterii anammox w kontekście wykorzystania ich w urządzeniach technologicznych oczyszczania ścieków;
- potwierdzenie przydatności metod identyfikacji bakterii PCR NGS w badaniach zbiorowisk mikroorganizmów w osadzie czynnym oraz wytworzonych w formie biofilmów na stałych nośnikach.

Niewątpliwie istotnym efektem przeprowadzonych prac eksperymentalnych było opracowanie innowacyjnej konstrukcji modułu oraz sposobu immobilizacji kultur bakterii anammox na nośniku porowatym, zgłoszonych jako wynalazki do Urzędu Patentowego.

Reasumując, pod względem merytorycznym temat został opracowany właściwie, a przyjęte w rozprawie założenia metodyczne, analiza i interpretacja wyników badań pozwoliły na zweryfikowanie hipotez badawczych i odpowiedź na postawione przez Autorkę pytania.

5. Uwagi do rozprawy doktorskiej

W trakcie analizy rozprawy doktorskiej nasuwają się pewne uwagi, sugestie i pytania:

- na stronie 112 podano czas zamrożenia wycinka agrowłókniny 41 dni, na stronie 136 – 31 dni, uwzględniając daty graniczne powinno być 41 dni;
- na stronie 110 (tabela 6) podano czas aktywacji modułu IV 36 dni, na stronie 114 (tabela 8), 153, 155 (tabela 21), 172, 175 (tabela 29), 180 – 37 dni, uwzględniając daty graniczne powinno być 36 dni;
- czy przy określaniu parametrów konstrukcyjnych modułów doświadczalnych kierowano się konkretnymi wytycznymi?
- na stronie 112 (pkt. 1), gdzie wymieniono oznaczenia wykonywane w przesączu pożywki, obok jonów amonowych i azotanowych powinno być „azotynowych”;
- z tytułu rozdziału 5.7. wynika, jakoby metodyka badań w III etapie nie dotyczyła modułu III, tymczasem opis dotyczy trzech modułów (III, IV i V);
- w rozdziałach 5.6.2, 5.6.3. i 5.6.4. (strony 115-117), w opisie metodyki badań realizowanych w II etapie z wykorzystaniem modułów III, IV i V podano terminy badań, które mogą wskazywać na pewną niespójność w harmonogramie badań i wprowadzać dezorientację. We wspomnianych podrozdziałach wymieniono okresy badań kończące się w maju 2021 roku, tymczasem zgodnie z rozdziałem 5.7.1. badania III etapu rozpoczęto w lutym 2021 roku;

- w rozdziale 5.8. nie podano definicji azotu mineralnego, na którą powołano się na stronie 114, a jedynie wykaz oznaczeń analitycznych, wyjaśnienie definicji powinno nastąpić w momencie pierwszego przywołania pojęcia w tekście;
- opisy w niektórych podrozdziałach części metodycznej są bardzo ograniczone i nie wskazują jasno na główne założenia i zasady prowadzenia eksperymentów (np. podrozdział 5.6.3., 5.7.4.);
- w oparciu o jakie zasady określano terminy wymiany pożywek w czasie eksperymentów z poszczególnymi modułami?
- na stronie 117 (2 wiersz), przy opisie układów doświadczalnych z różnymi źródłami azotu powinno być „azotyny”;
- w części metodycznej używane są zamiennie określenia form azotu mineralnego (w postaci jonów lub czystego składnika, np. jony amonowe – azot amonowy), zgodnie z metodyką oznaczano stężenia jonów amonowych, azotynowych i azotanowych i takie określenia należało by stosować w opisie metod analitycznych;
- w rozdziale 5.10., wiersz 6. i 8. należało by podać numery modułów, z których pobrano próby do badań metodą FISH, w rozprawie posługiwano się numerami modułów i etapów badań, a nie numerami eksperymentów; w wierszu 6. niepotrzebnie podano oznaczenie „II” przy „immobilizacji”;
- tytuły niektórych podrozdziałów w części obejmującej prezentację i analizę wyników badań nie mają charakteru problemowego, nie odnoszą się do istoty danego podrozdziału, jaką jest analiza wybranego wskaźnika, zjawiska czy zależności (np. 6.10.3. „Stan modułu III w dniu 9.12.2021”; 6.10.6 „Stan modułu V w dniu 1.09.2022”). W niektórych tytułach niepotrzebnym wydaje się dodawanie numerów modułów skoro wskazano istotę eksperymentu (np. 6.8.1. „Badania nad wykorzystaniem azotynów jako jedyne źródła azotu z zastosowaniem modułu III”, czy 6.10.2 „Eksperyment z zastosowaniem warstwy tkaniny lnianej jako odstępniaka w module V”);
- w większości eksperymentów prowadzonych z wykorzystaniem modułów z immobilizowaną biomasą bakterii anammox następował spadek sum stężeń azotu mineralnego w funkcji czasu, jednakże notowano również odstępstwa od tej reguły. W eksperymentach z modułami I i II (np. tabela 14 – pożywka z 5.05.2018r.; tabela 15 – pożywka z 13.03.2018r.), po okresowym spadku, sumy stężeń azotu mineralnego wzrastały, pomimo że pożywki nie podlegały wymianie. Czym mogło być to spowodowane?
- na stronie 146 powinno być „dystrybuanty”;

- w tytułach tabel 25 i 26 użyto określeń „eksperyment IV” i „eksperyment V”, co wydaje się zbędne zważywszy na i tak bardzo skomplikowane nazewnictwo wynikające z liczby modułów i etapów eksperymentów, lepiej posługiwać się określeniami zgodnymi z przyjętym w rozprawie schematem (nr modułu i nr etapu);

- czym można wytłumaczyć wysokie dobowe szybkości ubytku azotu mineralnego na początku I etapu badań z modułami III (tabela 24), IV (tabela 25) i V (tabela 26)?

Zamieszczone powyżej uwagi nie wpływają na wartość naukową rozprawy. W większości mają one charakter techniczny i nie wymagają wyjaśnień, niektóre z nich zaś mają się stać przyczynkiem do podjęcia dyskusji w trakcie publicznej obrony.

6. Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Kamili Hamal jest wartościowym opracowaniem naukowym. Z jednej strony stanowi ona szerokie kompendium wiedzy z zakresu oczyszczania ścieków, z drugiej zaś, zbiór cennych wyników i wniosków o praktycznym znaczeniu dla rozwoju nowoczesnych metod oczyszczania ścieków. Zakres rozprawy i problem naukowy, którego rozwiązanie ona stanowi w pełni mieszczą się w dyscyplinie ochrona i kształtowanie środowiska. Mgr inż. Kamila Hamal wykazała się umiejętnością planowania i prowadzenia badań oraz interpretowania ich wyników w celu zweryfikowania sformułowanej hipotezy badawczej. Przyjęte schematy prowadzenia eksperymentów oraz metody badań i opracowania ich wyników są właściwe. Pewne niedociągnięcia rozprawy, głównie od strony formalnej nie umniejszają jej walorów merytorycznych.

Biorąc pod uwagę powyższe stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Kamili Hamal pt. „Immobilizacja bakterii anammox na agrowłókninach” spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zawarte w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) obowiązującej na podstawie ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669). W związku z tym wnioskuję do Rady Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Kamili Hamal do publicznej obrony.

Michał Kowalec