

dr hab. inż. Justyna Koc-Jurczyk, prof. UR
Zakład Podstaw Rolnictwa i Gospodarki Odpadami
Instytut Nauk Rolniczych, Ochrony i Kształtowania Środowiska
Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego
ul. Ćwiklińskiej 1B, 35-601 Rzeszów

Rzeszów, 19.04.2023

Recenzja

Rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Kamili Hamal

pt. Immobilizacja bakterii anammox na agrowłókninach

wykonanej na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu

Podstawa opracowania recenzji

Recenzja została przygotowana na podstawie Uchwały Rady Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 08.02.2023 r. oraz w oparciu o rozprawę doktorską Pani mgr inż. Kamili Hamal wykonaną pod opieką naukową prof. dr hab. inż. Janusza Łomotowskiego oraz promotora pomocniczego, dr inż. Magdaleny Domańskiej, przesłaną mi przez Przewodniczącego ww. Rady Dyscypliny, Pana prof. dr hab. inż. Krzysztofa Pulikowskiego.

Zasadność podjętej tematyki

Odcieki z komór fermentacyjnych osadów ściekowych powstających na oczyszczalniach ścieków komunalnych zawierają wysokie stężenia azotu amonowego, przez co niekorzystnie wpływają na pracę głównego ciągu oczyszczalni ścieków, do którego zazwyczaj są zwracane. Zawierają one azot amonowy w stężeniu mieszczącym się w przedziale 1-1,5 g/m³, którego ładunek dobowy stanowić może około 15% całego ładunku dobowego azotu Kejdahla dopływającego do oczyszczalni. Jednym z rozwiązań technologicznych redukujących to obciążenie może być podczyszczanie odcieków przed zawróceniem ich do głównego ciągu oczyszczalni. Metodami dedykowanymi do usuwania ze ścieków wysokich ładunków azotu amonowego, zwłaszcza przy niekorzystnym stosunku C/N, są kombinacje znanych procesów biologicznych, takie jak: Sharon, Anammox, Oland czy Canon. Procesy te prowadzone są przez wyspecjalizowane grupy mikroorganizmów osadu czynnego, które mogą charakteryzować się odmiennymi wymaganiami środowiskowymi. Optymalizacja warunków procesu dla danego składu ścieków promuje wybrane grupy mikroorganizmów, co skutkuje zwiększeniem skuteczności usuwania zanieczyszczeń. Jedną z technik przydatnych szczególnie przy niedoborze źródeł węgla, jest immobilizacja biomasy mikroorganizmów. W celu immobilizacji biomasy, szczególnie mikroorganizmów charakteryzujących się powolnym wzrostem, coraz powszechniej stosuje materiały o różnej strukturze i składzie, czyli tak zwane nośniki biomasy. W ten obszar działań wpisują się badania Pani

mgr inż. Kamili Hamal, a przykładem takich nośników mogą być przenośne konstrukcje wykonane z włóknin, o konstrukcji analogicznej do spiralnych modułów stosowanych w technikach membranowych. Do oczyszczania ścieków wysokoobciążonych azotem amonowym oraz charakteryzujących się niekorzystnym stosunkiem C/N, wykorzystano pakiety pokryte bakteriami anammox, które charakteryzują się wrażliwością na niską temperaturę ścieków, wahania wartości pH, a także są łatwo wymywalne z urządzeń technologicznych oczyszczalni. Doktorantka swoje badania koncentrowała głównie na hodowli kultur bakteryjnych na specjalnie dobranych nośnikach, analizując przy tym wrażliwość bakterii na różne czynniki, takie jak zamrażanie czy skokowe zmiany stężenia azotu. Badania były prowadzone w warunkach laboratoryjnych, z zastosowaniem pożywek mineralnych o różnym składzie. Aby potwierdzić obecność i stan wybranych grup mikroorganizmów dokonano ich identyfikacji technikami fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH) oraz barwienia przyżyciowego komórek (LIVE/DEAD). W badaniach wykorzystano również sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) fragmentu bakteryjnego 16S rDNA w celu ustalenia składu zbiorowiska mikrobiomu zimmobilizowanego na zaproponowanych w pracy modułach.

Podjęta przez doktorantkę tematyka rozprawy jest jak najbardziej zasadna i wpisuje się w nurt badań związanych z ochroną i kształtowaniem środowiska. Dotyczy bowiem modyfikacji urządzeń ciągu technologicznego w celu podniesienia efektywności procesu oczyszczania ścieków charakteryzujących się niską proporcją C/N.

Struktura pracy

Dysertacja liczy 255 stron, a jej struktura jest typowa dla rozpraw o charakterze eksperymentalnym. Merytoryczną część pracy stanowi 7 rozdziałów, które obejmują: wprowadzenie, część wstępną, cele i hipotezy badawcze, opis prac eksperymentalnych, wyniki badań wraz z dyskusją oraz wnioski końcowe. Rozdziały poprzedza streszczenie napisane w języku polskim i angielskim.

Pierwszy rozdział stanowi próbę wprowadzenia we właściwą tematykę i cel pracy.

W drugim i trzecim rozdziale zaprezentowano przegląd literatury obejmujący zagadnienia dotyczące: historii oczyszczania ścieków, rozwoju metod analitycznych w mikrobiologii sanitarnej, mechanizmów oraz technologii oczyszczania biologicznego, a także procesu Anammox. Rozdziały te charakteryzuje bardzo bogate piśmiennictwo, wykorzystane do zaprezentowania dotychczasowego stanu wiedzy w zakresie tematyki, której dotyczy niniejsza rozprawa doktorska.

Z kolei w rozdziale czwartym „Cele i hipotezy badawcze” przedstawiono uzasadnienie podjęcia badań, takie jak wyzwania związane z oczyszczaniem ścieków o niskim stosunku C/N oraz problematykę utrzymywania biomasy bakterii anammox w ciągu technologicznym oczyszczalni. W rozdziale tym wskazano główny cel pracy, hipotezę badawczą oraz sformułowano trzy pytania badawcze.

Na wstępie bardzo rozbudowanego „Opisu prac eksperymentalnych”, przedstawiono opis badań prowadzonych wspólnie przez MPWiK SA we Wrocławiu, Politechnikę Wrocławską oraz Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, które stanowiły podstawę do rozpoczęcia analizy problemu, jaki postawiła przed sobą Doktorantka. W następnej części opisano konstrukcję modułów – nośników biomasy oraz proces ich biologicznej aktywacji. W dalszej części rozdziału piątego bardzo szczegółowo przedstawiono metodykę i harmonogram prowadzenia doświadczeń na poszczególnych modułach oraz scharakteryzowano poszczególne etapy badań. Przedstawiono również metodykę przeprowadzonych oznaczeń analitycznych, sposób wykonania analizy przemian mineralnych form azotu, sposób identyfikacji bakterii techniką FISH, barwienia metodą LIVE/DEAD

oraz identyfikacji jednostek taksonomicznych bakterii za pomocą techniki NGS. Rozdział ten kończy metodyka badania składu granulometrycznego osadów.

Rozdział „Wyniki badań” obejmuje aż 89 stron i stanowi zdaniem recenzenta najbardziej wartościową część pracy, ponieważ zawiera szczegółową analizę dość unikalnych danych, które zostały następnie wnikliwie przedyskutowane przez autorkę.

Część merytoryczną pracy zamyka dziesięć „Wniosków końcowych”.

W pracy zawarto 116 rysunków, stanowiących opracowanie własne autorki lub zawierających prawidłowo wskazane źródła pochodzenia, oraz 59 zestawień tabelarycznych, stanowiących w większości opracowanie własne autorki.

Liczba zacytowanych w pracy źródeł bibliograficznych jest bardzo duża i obejmuje aż 562 pozycji, w tym jedynie 44 polskojęzyczne.

Ocena merytoryczna pracy

Praca charakteryzuje się bardzo obszernym wstępem (aż 87 stron), opisującym m.in. historię kanalizacji czy proszków do prania, i jakkolwiek są to bardzo ciekawe informacje, podane przez autorkę w interesujący sposób, można by je opublikować jako odrębną pracę, a sama rozprawa nie straciłaby bez nich swojej wartości. Z kolei recenzent czuł pewien niedosyt w zakresie dokładnej informacji na temat np. wpływu siarczków, wolnego amoniaku czy kwasów azotowych na mikroorganizmy prowadzące proces beztlenowego utleniania amoniaku. Istnieją bowiem liczne publikacje określające dokładne dawki tych związków hamujące aktywność poszczególnych jednostek taksonomicznych bakterii. Owszem, doktorantka podała wzory na obliczenie powyższych, ale usystematyzowanie danych o ich wpływu na bakterie podniosłoby wartość pracy. Nie znalazłam również danych dotyczących konstrukcji reaktora, w szczególności kształtu i proporcji, co ma podstawowe znaczenie dla tworzenia struktury granul. W tej części pracy brakuje także informacji o samych nośnikach biomasy, ich podziale, właściwościach itd. Pierwsza wzmianka na ten temat pojawia się dopiero w „Celu i hipotezach”. Wspomniano również procesy Oland czy Canon ale nie poświęcono im więcej uwagi. Dlatego też uważam, że w przyszłych publikacjach należałoby unikać informacji zbyt odbiegających od ścisłego tematu pracy, na rzecz wymienionych powyżej.

Rozdziały „Cel i hipotezy badawcze”, a szczególnie „Opis prac eksperymentalnych” są bardzo rozbudowane i czytelnik może odnieść wrażenie pewnego nieuporządkowania zawartych w nich treści, co utrudnia zrozumienie koncepcji prowadzonych badań. Na przykład na str. 117 „Opisu prac eksperymentalnych” pojawia się wtórna hipoteza badawcza. Podobnie, przeniesienie fragmentów dotyczących opisu wypełnień, agrowłóknin czy przekładek z Inu, stanowiących tak naprawdę opis teoretyczny, do wcześniejszych rozdziałów, znacznie poprawiłoby czytelność pracy oraz ją uporządkowało. W części metodycznej pracy nie zawarto również wyczerpującego opisu metod statystycznych wykorzystanych do opracowania uzyskanych wyników badań, a takie pojawiają się w następnym rozdziale „Wyniki badań”.

Również w tym rozdziale („Wyniki badań”) doktorantka, w mojej ocenie, nie uniknęła pewnej niekonsekwencji przy prezentacji i omówieniu uzyskanych wyników badań. Uważam, że bardziej logicznym byłoby rozpocząć ten rozdział od charakterystyki osadu czynnego w reaktorach SBR, w których prowadzono zaszczepianie modułów wykorzystywanych w badaniach, oraz opisu mechanizmu zatrzymywania cząstek osadu w czasie aktywacji modułów (czyli odpowiednio podrozdziałów 6.2 oraz 6.3), a dopiero w następnej kolejności opisu uzyskanych w poszczególnych eksperymentach wyników.

W opisie wyników badań uzyskanych w poszczególnych eksperymentach wykazano, że na modułach włókninowych możliwa jest trwała immobilizacja kultur bakterii anammox, co pozwala na przenoszenie biomasy tych bakterii z miejsca immobilizacji do innych urządzeń ciągu technologicznego oczyszczalni, co może okazać się przydatne w praktyce. Według autorki, pozwala to między innymi na zaoszczędzenie czasu potrzebnego na immobilizację mikroorganizmów, co jest szczególnie istotne w przypadku bakterii anammox, których hodowla jest uciążliwa i czasochłonna. Zalety nośników wykorzystywanych w reaktorach biologicznych w celu zatrzymania biomasy, takich jak na przykład kształtki Kaldnes, nośniki Liapor czy Linpor, jak również różnorodnych materiałów strukturalnych o dużej powierzchni właściwej, na przykład gąbek poliuretanowych, są stosunkowo dobrze poznane, dlatego przebadane przez Doktorantkę moduły z agrowłóknin można uznać za *novum*. Należy podkreślić, że znalazło to potwierdzenie w złożonych wnioskach patentowych.

Dużą wartością dodaną przeprowadzonych badań, jest wykazanie wpływu odczynu na rozwój poszczególnych gatunków bakterii z rodziny *Candidatus Brocadia*ceae. Wartość pH niższa od 8,0 sprzyja rozwojowi bakterii *Ca. Brocadia*, natomiast przy wyższej niż 8,0 dochodzi do rozwoju *Ca. Kuenenia*. Jak zauważyła doktorantka, w literaturze brakuje danych na ten temat, dlatego też fakt ten powinien być potwierdzony kolejnymi eksperymentami. Równie ważne jest wykazanie, że zastosowanie techniki sekwencjonowania nowej generacji kwasów nukleinowych wyizolowanych z osadów odkładających się na modułach, pozwala lepiej zrozumieć wpływ czynników środowiskowych i czasu eksploatacji nośnika na skład gatunkowy biomasy.

Uzyskane wyniki potwierdzają również, że przemiany mineralnych form azotu zależą od zespołu wielu czynników i zmiennych warunków środowiskowych (technologicznych). Doktorantka wykazała m.in., że czas aktywacji modułu może mieć wpływ na sprawność usuwania azotu amonowego w procesie Anammox; zamrożenie modułów uprzednio uaktywnionych biomasą bakterii anammox wpływa na zmiany konsorcjum bakterii obecnych w zimmobilizowanej na agrowłókninie biomasy, ale nie zanika ich aktywność biochemiczna, a uwalnianie z modułów placzków filtracyjnych przyczyniać się będzie do „zaszczepienia” biomasy biorącej udział w oczyszczaniu ścieków w pożądane bakterie usuwające azot amonowy na drodze nitracji i denitracji.

Niezwykle cennych danych dostarczają badania struktury zbiorowisk bakterii zasiedlających różne warstwy nośników biomasy, a także wykonanie analizy granul w osadzie czynnym, mające bezpośrednie przełożenie na ilość bakterii anammox oraz możliwość tworzenia się placzka powierzchniowego na modułach z biomasą.

Użyty w konstrukcji modułów materiał, charakteryzujący się zróżnicowaną pod względem gęstości powierzchnią, ma również pozytywny wpływ na efekt oczyszczania ścieków. Jak wykazała Doktorantka zawiesiny odkładały się intensywnie w obszarach o zwiększonej porowatości agrowłókniny, natomiast w niezakolmatowanych obszarach może dochodzić do swobodnego przemieszczania się azotu cząsteczkowego, będącego produktem końcowym procesu denitracji prowadzonym przez bakterie anammox. Pozwala to na wyeliminowanie zjawiska gromadzenia się produktów przemian biochemicznych bakterii wewnątrz modułu. Wprowadzenie lnianej tkaniny pomiędzy warstwy agrowłóknin nawiniętych na moduł wpływa korzystnie na rozwój bakterii anammox, zwiększa ich aktywność oraz intensyfikuje wydzielanie się azotu cząsteczkowego. Dodatkowo, agrowłóknina stanowi ochronę dla bakterii anammox zasiedlających lnianą tkaninę przed mechanicznymi i hydraulicznymi uszkodzeniami.

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że wartości dobowych szybkości ubytku azotu mineralnego (vN_{min}) oraz dobowych, powierzchniowych szybkości usuwania ładunku azotu mineralnego (vN_{Pow}) są nie tylko miarą aktywności bakterii anammox, ale zależą również od aktywności biochemicznej innych gatunków bakterii, wchodzących w skład mikrobiomu biofilmów powstałych na modułach doświadczalnych, oraz cząstek pozostających w toni pożywki. Dlatego też wartości te mają wartość diagnostyczną w ocenie zdolności usuwania azotu mineralnego, co można wykorzystać w praktyce inżynierskiej.

Uwagi krytyczne

Praca została napisana poprawnym językiem i stylem. Czytelność metodyki oraz prezentacji uzyskanych wyników badań poprawiłoby przedstawienie ich w formie graficznej, w postaci wykresów, a nie, jak przyjęła autorka, tabelarycznej. W pracy zauważono literówki i błędy edycyjne, ale przy tak dużej objętości jest to nieuniknione.

W mojej opinii rozdziały 2 i 3 powinny stanowić jeden „Część teoretyczna”, rozdział 5 powinien być zatytułowany „Metodyka”, a 6 – „Wyniki badań i dyskusja”. Część akapitów, wspomnianych już wcześniej, można przenieść do części teoretycznej, czy nawet Metod badawczych (np. rys. 42), dzięki temu praca zyskałaby na przejrzystości.

Z drobnych błędów, zauważyłam również brak wyjaśnień akronimów IFAS czy NOB podczas ich pierwszego użycia (wyjaśnienie NOB pojawiło się dopiero na 47 stronie), brakuje również wyjaśnienia znaczenia pojęć nitritacja i denitrytacja. W tabeli 4 umieszczono proces Anammox, w tekście zaś jest mowa o Sharon i dopływie *Nitrosomonas*. W tabeli 5 wymieniono m.in. proces Sharon, jako proces z bakteriami anammox, nie ma o tym informacji wcześniej, przy opisie bakterii prowadzących ten proces.

Na str. 131 podano inną ilość dni niż w metodyce (str. 111). Informacje zawarte w tabeli 20 są powtórzeniem tabeli 18, i są wystarczające do stwierdzenia różnic w składzie procentowym mikroorganizmów osadu czynnego, w zależności od czasu namywaniania modułów III i IV. Brakuje takiego zestawienia dla modułu V.

Uważam, że pomimo tych kilku uwag w stosunku do Dysertacji, nie zmniejsza to wartości przedstawionej mi do recenzji rozprawy.

Treść przedstawiona w Rozprawie rozbudziła jednocześnie ciekawość naukową recenzenta, czego wyrazem są następujące pytania:

1. Jakiej długości były warstw geowłókniny na modułach I i II? Czy na modułach III – V zastosowaną ta samą agrowłókninę co na modułach I i II?
2. Moduł I i II namywane były w różnych datach, a co za tym idzie różnych temperaturach i przy różnych składach wód odciekowych z fermentacji, czy fakt ten mógł mieć wpływ na aktywność bakterii anammox?
3. Próbkę do analizy FISH z modułu V pobierano 1.09.2022, a na stronach 116 i 118 podano, że doświadczenie z modułem V było prowadzone do 16.03.2022. Skąd wynika ta rozbieżność dat?
4. Czy wynik uzyskany za pomocą techniki NGS, wyrażony jako odsetek udziału danej jednostki taksonomicznej, ma charakter ilościowy, czy raczej jakościowy? Mikroorganizmy identyfikowano również metodą hybrydyzacji in situ. W jaki sposób uzupełniają się analizy wykonane obiema technikami? Czy technika FISH może dostarczyć danych ilościowych?
5. Wniosek wyciągnięty na str. 174: „Spadek ten (obniżenie tempa usunięcia azotu z pożywki) był prawdopodobnie efektem obumarcia i rozpadu części komórek bakterii anammox oraz

zmniejszeniem aktywności enzymatycznych tych bakterii” jest właściwy, jednak należy się zastanowić, czy obserwowane zjawisko nie wynikało z warunków stresowych, związanych ze zmianą składu pożywki (m.in. brak węgla), a obumarcie bakterii było jednym z tego skutków?

6. Na str. 201 podano: „Skokowe zmiany składu pożywek na zewnątrz i wewnątrz modułu V nie wpłynęły zatem na aktywność bakterii anammox”. Natomiast, na str. 205: „Największy przyrost bakterii anammox nastąpił w osadach modułu V w czasie pierwszej fazy II etapu badań, w której okresowo zmieniano zawartość azotu amonowego, azotynów i azotanów na zewnątrz i wewnątrz modułu. Takiego wyniku nie spodziewano się na etapie planowania eksperymentu”. Czy można więc rozumieć, że zaobserwowano przyrost ilości bakterii, ale bez wzrostu ich aktywności?

Ocena końcowa

Pani mgr inż. Kamila Hamal, wykazała się niezbędną wiedzą do prowadzenia badań naukowych. Cel pracy został osiągnięty, a założone hipotezy badawcze udowodnione. Doktorantka wykazała się odpowiednim przygotowaniem teoretycznym, znajomością współczesnej literatury dotyczącej tematu pracy oraz umiejętnością planowania i prowadzenia badań. Autorka pokazała, że potrafi właściwie wykonać zamierzone prace badawcze oraz prawidłowo zinterpretować uzyskane wyniki badań. Tematyka i zakres pracy jest ściśle związany i wpisuje się w nurt badawczy dotyczący zaszczepienia przenośnych modułów bakteriami wykorzystywanymi następnie do oczyszczania ścieków o niekorzystnym stosunku C/N.

Tematyka recenzowanej pracy mieści się w dyscyplinie ochrona i kształtowanie środowiska.

Biorąc po uwagę zaprezentowaną powyżej ocenę osiągnięć Autorki rozprawy stwierdzam, że Jej praca pt. „Immobilizacja bakterii anammox na agrowłókninach” spełnia wymagania określone w art. 14 ust. 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz. U. 2017 poz. 1789), co upoważnia mnie do przedstawienia Wysokiej Radzie Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka Wydziału Inżynierii Kształtowania Środowiska i Geodezji Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosku o dopuszczenie mgr inż. Kamili Hamal do dalszych etapów przewodu doktorskiego, w tym publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

J. Koc-Imcaj.