

Gdańsk, 19 sierpnia 2019 r.

Prof. dr hab. inż. Jacek Małania, prof. zw. PG
Politechnika Gdańska
Wydział Inżynierii Lądowej i Środowiska
Katedra Inżynierii Sanitarnej

**Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr. inż. Mariusza Tomaszewskiego
pt. „Wspomaganie procesu anammox w niskich temperaturach
zredukowanym tlenkiem grafenu”**

przygotowanej pod opieką dr hab. inż. Aleksandry Ziemińskiej-Buczyńskiej, prof. PŚ (promotora) oraz dr. inż. Grzegorza Cemy (promotora pomocniczego)

1. Podstawa opracowania recenzji

Formalną podstawą recenzji jest uchwała Rady Wydziału Inżynierii Środowiska i Energetyki Politechniki Śląskiej przekazana mi w piśmie Prodziekana Wydziału ds. Nauki i Organizacji dr hab. inż. Joanny Kalki, prof. PŚ, z dn. 5.07.2019 r.

2. Ocena formalna rozprawy i celowości podjęcia tematu badawczego

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska jest opracowaniem obejmującym 102 strony. Zasadniczą część stanowi spójny tematycznie zbiór czterech artykułów, w których Kandydat jest pierwszym współautorem, opublikowanych w czasopismach naukowych. Taka forma rozprawy doktorskiej, chociaż na razie rzadko spotykana na polskich uczelniach, jest formalnie dopuszczalna. Moim zdaniem, jest wręcz godna polecenia i naśladowania.

Załączone oświadczenia, jako integralna część opracowania, określają indywidualny wkład poszczególnych współautorów w powstanie tych prac. Wkład Kandydata, oszacowany na 50-60%, polegał głównie na przeglądzie literatury, zaplanowaniu i wykonaniu badań, opisie uzyskanych wyników i współudziale w przygotowaniu dyskusji. Należy podkreślić, że wszystkie cztery artykuły opublikowano w czasopismach zagranicznych, należących do grupy najbardziej renomowanych w inżynierii środowiska, tj. Water Research (IF = 7,051), Science of the Total Environment (IF = 4,610), Chemosphere (dwie) (IF = 4,427). Jest to

najlepszy dowód na to, jak wysoki poziom naukowy reprezentuje recenzowana rozprawa. Warto też zauważyć już bardzo znaczący odzew środowiska naukowego na całym świecie, mierzony liczbą cytowań w bazie Scopus, na dwie pierwsze prace opublikowane w 2017 r. (publikacja 1 – 37 cytowań, publikacja 2 - 10 cytowań).

Opracowanie uzupełnia część wstępna, napisana w jęz. polskim, zawierająca syntetyczny opis procesu anammox, sformułowanie tezy badawczej, cel i zakres pracy, opis metodyki i planu badań, a także posumowanie wyników, wnioski i proponowane kierunki dalszych badań. Ta część pracy została bardzo starannie przygotowana pod względem edytorskim.

Główny cel rozprawy, będący odzwierciedleniem tytułu, został sformułowany następująco: „*Ocena wpływu zredukowanego tlenku grafenu (RGO) na aktywność bakterii anammox w niskich temperaturach (10-20°C)*”. Kandydat przyjął hipotezę badawczą, że „*efektywność procesu anammox w temperaturach poniżej wartości optymalnej (<20°C) może być zwiększona poprzez dodatek RGO*”. Choć nie miało to żadnego wpływu na wartość pracy, to jednak moim zdaniem, hipoteza została sformułowana niezbyt trafnie z dwóch powodów:

- z powyższego stwierdzenia można wyciągnąć wniosek, że 20°C to temperatura optymalna dla procesu anammox, co nie jest zgodne z prawdą,
- wyniki przedstawione w publikacjach sugerują, że badana była raczej szybkość procesu/aktywność bakterii anammox, a nie efektywność procesu. Szybkość procesu nie jest jednoznaczna z jego efektywnością.

Sam proces anammox został odkryty w Holandii ponad 20 lat temu. W praktyce jest drugim etapem złożonego procesu deamonifikacji, czyli częściowej nityracji i anammox. Deamonifikacja posiada wiele zalet w stosunku do konwencjonalnej nityfikacji-denityfikacji, ale również szereg wad i ograniczeń. Obie strony procesu Kandydat trafnie scharakteryzował we wprowadzeniu (tabela 1, s. 12). Ze względu na specyfikę odcieków z procesów beztlenowej fermentacji osadów ściekowych (wysoka temperatura, wysokie stężenia azotu, niskie proporcje C/N), od momentu odkrycia proces anammox był intensywnie badany pod kątem zastosowań w bocznym ciągu technologicznym komunalnych oczyszczalni ścieków. Ten obszar badawczy uznaje się obecnie za dobrze rozpoznany, czego dowodem są liczne wdrożenia w skali technicznej na całym świecie.

Podjęta przez Kandydata tematyka badawcza posiada dwie istotne zalety. Po pierwsze, jest ukierunkowana na zastosowanie procesu anammox w ciągu głównym, nie tylko ze względu na badanie procesu w niskich temperaturach, ale również na zastosowanie niższych stężeń azotu w dopływie, o czym Kandydat wspomina na s. 23 („*Dobre wartości [stężeń azotu ogólnego] były (...) zbliżone bardziej do wartości obserwowanych w głównym ciągu komunalnej oczyszczalni ścieków*”). W ten sposób, praca wpisuje się bardzo dobrze w nurt najnowszych badań prowadzonych na całym świecie, o czym świadczą stosowne wzmianki w dokumencie Międzynarodowego Stowarzyszenia Wodnego (IWA) pt. „*Global Trends and Challenges in Water Science, Research and Management*” (2016) oraz raporcie Water Environment Research Foundation (USA) pt. „*Mainstream Deammonification*” (O’Shaughnessy, 2015).

Wdrożenie deamonifikacji w ciągu głównym jest szczególnie pożądane z uwagi na możliwość osiągnięcia wysokiej efektywności usuwania azotu przy jednoczesnym uzyskaniu samowystarczalności energetycznej oczyszczalni lub nawet pozytywnego bilansu energii. Badania deamonifikacji w ciągu głównym zostały zainicjowane dopiero na początku obecnej dekady, a rozwój procesu następuje powoli. W przeglądowej publikacji, Cao i wsp. (2017) (*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 101, 1365–1383) wymieniają trzy główne wyzwania, przed którymi stoją te badania. Jest wśród nich problem niewielkiej aktywności bakterii anammox w niskich temperaturach (<15°C), czym właśnie zajął się Kandydat w swojej rozprawie doktorskiej.

Oprócz aktualności, drugą zaletą podjętej tematyki badawczej jest to, że dotyczy ona obszaru jeszcze słabo rozpoznanego, ale jednocześnie posiadającego duży potencjał naukowy i znaczenie praktyczne. Pomimo tego, że badania nad wykorzystaniem RGO do wspomaganie procesu anammox były podejmowane wcześniej przez inne zespoły badawcze, to nie było doniesień literaturowych o efektach stosowania RGO w niskich temperaturach oraz wzajemnym oddziaływaniu RGO i mikroorganizmów.

3. Ocena merytoryczna rozprawy

Przedstawione publikacje ukazują szereg atutów rozprawy - od starannie przygotowanej koncepcji badań, poprzez wykorzystanie nowatorskich narzędzi badawczych, po analizę wiarygodności wyników badań i ich wnikliwą dyskusję.

Wyznaczony cel główny pracy Kandydat zamierzał osiągnąć poprzez realizację następujących zadań badawczych (nazwanych w pracy celami szczegółowymi):

- określenie wpływu temperatury na aktywność bakterii anammox,
- określenie wpływu pH na aktywność bakterii anammox w niskich temperaturach,
- ocenę krótkoterminowych efektów wpływu RGO na aktywność bakterii anammox w szerokim zakresie temperatur,
- ocenę długoterminowych efektów wpływu RGO na efektywność procesu anammox w niskich temperaturach,
- ocenę wpływu RGO na strukturę mikrobiologiczną biocenozy bakteryjnej,
- ocenę wpływu aktywności mikrobiologicznej na strukturę i właściwości RGO.

METODYKA BADAŃ. Dzięki właściwie przyjętej metodyce, dowodzenie naukowe staje się sensowne i wartościowe, co widoczne jest w recenzowanej pracy. Koncepcja badań jest przejrzysta i logiczna, w której kolejne zadania wynikają z badań zrealizowanych w etapach poprzedzających. Znalazło to też odzwierciedlenie w kolejności publikacji w przedstawionym cyklu. Bardzo mocną stroną rozprawy są zastosowane narzędzia badawcze. Kandydat posiadał umiejętność posługiwania się metodami statystycznymi i co istotne, wykorzystał ją już na etapie planowania eksperymentu. Widoczny jest tu wpływ pracy Daverey'a i wsp. (2015) (*Int. Biodeterior. Biodegrad.* 102, 89-93), którzy wykorzystali metodę statystyczną, tzw. centralny plan

kompozycyjny, do zbadania wpływu temperatury i pH na aktywność bakterii anammox. Kandydat zaplanował swoje doświadczenia, opisane w publikacjach 2 i 3, wykorzystując tę samą metodę.

W publikacji 1, w oparciu o bardzo starannie i rzetelnie przeprowadzony przegląd literatury, Kandydat podsumował dotychczasową wiedzę na temat wpływu temperatury i odczynu na szybkość procesu anammox, a następnie przeprowadził meta-analizę danych literaturowych. Meta-analiza to statystyczna metoda badawcza, która w ostatnim czasie zyskała na znaczeniu w naukach medycznych i społecznych. W inżynierii środowiska, chociaż znana od lat, nie była dotychczas powszechnie stosowana. Jedną z pierwszych i najbardziej znanych prac w technologii oczyszczania ścieków jest artykuł pt. „*Meta-Analysis of Mass Balances Examining Chemical Fate during Wastewater Treatment*”, autorstwa J. Heidlera i R.U. Haldena, opublikowany w czasopiśmie *Environmental Science & Technology* (2008). Meta-analiza umożliwia syntezę wyników wielu niezależnych badań, m.in. w sytuacji, gdy dostępne są jedynie zbiorcze wyniki tych badań w postaci danych literaturowych. Podejście takie pozwala rozszerzyć wnioski z pojedynczych badań na szerszą populację oraz zwiększyć wiarygodność otrzymanych wyników. Jako motywację do przeprowadzenia meta-analizy, Kandydat podał różnorodność wartości pH, przy których badano wpływ temperatury na proces anammox.

W kolejnym etapie, opisanym w publikacji 2, Kandydat przeprowadził własne badania wpływu tych parametrów (tj. temperatury i pH) na szybkość procesu anammox. Temu celowi służyła seria krótkookresowych testów porcjowych, najpierw w zakresie temperatur 10-40°C przy stałym pH (= 7,5), a następnie w zakresie pH 6,0-9,0 przy stałej temperaturze (= 30°C). Trzecia seria badań została zaplanowana zgodnie ze wspomnianą statystyczną metodą planowania eksperymentu, tzn. centralnym planem kompozycyjnym.

Dwie pierwsze publikacje, chociaż nawiązują tylko częściowo do tematu rozprawy, to stanowiły dobry punkt wyjścia do badań właściwych nad wpływem RGO na proces anammox, których wyniki zostały przedstawione w publikacjach 3 i 4. Ten etap badań Kandydat rozpoczął od przeprowadzenia pomiaru jednostkowej aktywności bakterii anammox (ang. specific anammox activity (SAA)) w serii krótkookresowych testów porcjowych w szerokim zakresie temperatur (10-30°C) dla różnych dawek RGO. Zakres stężeń (15-85 mg/L) został przyjęty na podstawie danych literaturowych oraz własnych badań wstępnych. Do planowania eksperymentu ponownie wykorzystano centralny plan kompozycyjny.

Analiza uzyskanych wyników badań krótkookresowych umożliwiła wybór stężenia RGO (określonego przez Kandydata jako „*optymalne*”) do dalszych, kluczowych badań długookresowych, które zostały opisane w publikacji 4. W tym miejscu należy docenić kolejny aspekt planowania badań przez Kandydata. Eksploatacja dwóch równoległych reaktorów sekwencyjnych (SBR) była prowadzona przez okres prawie jednego roku. Do jednego reaktora dawkowano RGO, podczas gdy drugi reaktor („*kontrolny*”) pracował bez dodatku RGO. Takie podejście wymagało od Kandydata znacznie większego wysiłku niż opieka tylko nad jednym

reaktorem. Umożliwiło jednak zebranie bogatego materiału do analizy porównawczej, co podniosło wartość i wiarygodność wyników badań. Na uwagę zasługuje też wykorzystanie w końcowym etapie badań nowoczesnych technik pomiarowych do oceny wzajemnego oddziaływanie RGO i populacji mikroorganizmów w badanych reaktorach SBR. Analiza metagenomowa, która obecnie wyznacza nowy kierunek badań mikrobiologicznych, została wykorzystana do oceny całego składu biocenozy bakteryjnej w reaktorach SBR. Z kolei zaawansowane techniki mikroskopowe i spektroskopowe (transmisyjna mikroskopia elektronowa oraz spektroskopia strat energii elektronów i spektroskopia Ramana) dostarczyły informacji o strukturze badanego nanomateriału na poziomie atomów.

WYNIKI BADAŃ I ICH DYSKUSJA. Najważniejsze wyniki badań zostały przedstawione czytelnie w formie zarówno tabelarycznej jak i graficznej (co nie dziwi z uwagi na rangę czasopism). W publikacji 1 i 2 jednoznacznie potwierdzono, że wraz ze spadkiem temperatury następuje znaczne zmniejszenie aktywności bakterii anammox. Zaproponowane w publikacjach 2 i 3 funkcje aproksymacyjne testowano za pomocą analizy wariancji ANOVA i wykazano, że dobrze opisywały one zależności pomiędzy badanymi zmiennymi niezależnymi, w tym temperatury, i zmienną zależną (aktywnością bakterii anammox) ($R^2 = 0,90$ i $0,96$). Możliwość wspomagania procesu anammox w niskich temperaturach poprzez dawkowanie RGO potwierdzono analizą statystyczną (publikacja 3) i badaniami empirycznymi (publikacja 4). Pomimo zaobserwowania zmian struktury i właściwości RGO w trakcie hodowli długookresowej, pozostawiono jako kwestię otwartą wzajemne oddziaływanie nanomateriału i mikroorganizmów.

W rozprawie doceniam wysoki poziom dyskusji uzyskanych wyników badań. W renomowanych czasopismach wnikliwa analiza wyników własnych badań w kontekście doniesień literaturowych jest podstawowym wymogiem przyjęcia artykułu do druku. Wszystkie publikacje Kandydata zawierają dyskusję na odpowiednim dla takich czasopism poziomie. Dyskusję cechuje nie tylko wnikliwość, ale również dojrzałość pod względem formułowania myśli, a także syntezy i interpretacji wyników badań. Szczególnie wysoko oceniam dyskusję w publikacji 3 na temat oddziaływania grafenu i jego pochodnych na komórki mikroorganizmów (punkt 3.2 „*Możliwe mechanizmy i teoretyczne implikacje*”) oraz dyskusję w publikacji 4 poświęconą przemianom biochemicznym, którym może ulegać RGO (punkt 3.1 „*Biotransformacja RGO*”).

Na końcu części wstępnej Kandydat sformułował 10 wniosków z całości przeprowadzonych badań, które są podsumowaniem wniosków cząstkowych zawartych w poszczególnych publikacjach. Wnioski potwierdzają zrealizowanie celu badań i zawierają istotne implikacje stosowania RGO dla wspomagania procesu anammox w niskich temperaturach. Jednak wniosek 8, pochodzący z publikacji 4, nie jest dla mnie do końca zrozumiały i wymaga wyjaśnienia (patrz: punkt 5, uwaga 5).

4. Osiągnięcia badawcze

Rozprawa stanowi oryginalny i nowatorski wkład Kandydata w poznanie procesu anammox, polegający przede wszystkim na:

- określeniu wpływu RGO na szybkość procesu anammox w temperaturach poniżej 20°C,
- wykazaniu, że dodatek RGO może zwiększyć szybkość procesu o co najmniej kilkanaście % oraz że efekt ten rośnie wraz ze spadkiem temperatury,
- zbadaniu wzajemnego, długookresowego oddziaływania RGO i zbiorowiska bakteryjnego w reaktorze SBR.

Do istotnych osiągnięć badawczych, zawartych w rozprawie, można zaliczyć też wyznaczenie:

- współczynników równań wielomianowych drugiego stopnia opisujących:
 - o wpływ temperatury i pH na względną aktywność bakterii anammox (na podstawie danych literaturowych),
 - o wpływ temperatury i pH na SAA (na podstawie badań własnych),
 - o wpływ temperatury i RGO na względną aktywność bakterii anammox (na podstawie badań własnych),
- wartości energii aktywacji w równaniu Arrheniusa dla różnych zakresów temperatury (10-20°C i 20-40°C) oraz potwierdzenie występowania tzw. „punktu przełamania” w temperaturze poniżej 20°C.
- stężenia RGO, przy których następowała inhibicja procesu anammox,
- składu biocenozy bakteryjnej za pomocą analizy metagenomowej oraz wykazanie dużej różnorodności występujących mikroorganizmów.

5. Uwagi i sugestie dotyczące przeprowadzonych i planowanych badań

Po zapoznaniu się z pracą, nie kwestionując ogromnej wartości naukowej pracy, mam kilka uwag o charakterze dyskusyjnym (1-5), dotyczących przeprowadzonych badań. Nasuwają mi się także sugestie (6-7) do rozważenia przez Kandydata w kontekście planu dalszych badań (s. 33). Proponuję, aby te kwestie stały się przedmiotem dyskusji w trakcie publicznej obrony rozprawy.

1. Kandydat często używa terminu „*optymalny zakres*” w odniesieniu do temperatury i odczynu, traktując go raczej zwyczajowo niż *stricte* naukowo. Dobrym tego przykładem jest odwołanie do pracy Strousa i wsp. (1999) w publikacji 1 (Tabela 8). Tabela ta, zgodnie z tytułem, ma zawierać „*Przegląd optymalnych zakresów pH*” („*Overview of the anammox optimal pH range*”). Podanego zakresu (pH = 6,7 – 8,3), Strous i wsp. nie nazywają jednak zakresem optymalnym, a „*zakresem fizjologicznym*” („*physiological range*”).

Na usprawiedliwienie Kandydata można dodać, że w literaturze funkcjonuje pojęcie „*optymalnego zakresu pH*” z pracy Strousa i wsp. (1999).

2. W publikacji 2 znajduje się informacja, że otrzymano różne wartości „*optymalnego*” pH w dwóch okresach inkubacji. Jako potencjalną przyczynę wymieniono odmienny odczyn podczas inkubacji. Wydaje się więc, że odczyn, przy którym prowadzona jest inkubacja bakterii anammox, może mieć istotny wpływ na „*optymalną*” wartość pH. Czy w takim przypadku, ma sens meta-analiza danych literaturowych, gdy hodowle były prowadzone w tak szerokim zakresie pH (7,2-8,1) (tabela 9, s. 52)? Dla przypomnienia, Kandydat podał różnorodność pH jako motywację do przeprowadzenia meta-analizy.
3. W publikacji 1 na rys. 1 (s. 52) można zaobserwować, że w wyższych temperaturach ($>25^{\circ}\text{C}$) przebieg zależności SAA od pH jest nietypowy, odmienny od oczekiwanego. Najniższa aktywność bakterii anammox występuje w przedziale pH = 7,6-7,8 i aktywność ta zaczyna rosnać wraz ze wzrostem lub spadkiem odczynu. Czym można wytłumaczyć taki przebieg zależności?
4. Kandydat słusznie zauważa, że wolny amoniak (FA) i kwas azotowy (III) (FNA) są istotnymi inhibitorami procesu anammox. W publikacji 2 na rys. 2 (s. 62) widoczny jest spadek SAA wraz ze wzrostem pH i stężenia FA. Nie jest więc jasne, który z czynników ma decydujący wpływ na inhibicję procesu anammox. Czy w związku z tym, nie należałoby rozdzielić inhibicję spowodowaną obecnością tych związków (FA, FNA) od inhibicji wywołanej wpływem pH?
5. Kandydat wymienia dwa prawdopodobne mechanizmy stymulacji procesu anammox wywołane zastosowaniem RGO. Z jednej strony jest to stymulacja wzrostu bakterii anammox (w temperaturze $>15^{\circ}\text{C}$), z drugiej – zwiększenie szybkości reakcji biochemicznej anammox (w temperaturze $<15^{\circ}\text{C}$). Jak można wyjaśnić to stwierdzenie w kontekście równań Monoda, z których wynika, że szybkości wzrostu mikroorganizmów i zużycia substratu są ze sobą nierozdzielnie związane? Czy nie chodziło raczej o zmianę stechiometrii procesu (współczynnika wydajności, Y), co jest hipotetycznie możliwe z uwagi na większe zużycie energii dla podtrzymania procesów życiowych w niskich temperaturach? Zmiana proporcji stechiometrycznych wraz ze spadkiem temperatury jest widoczna na rys. 5 w publikacji 4 (s. 83), przy czym zmiana ta może być też wywołana aktywnością innych grup bakterii (patrz: punkt poniżej).
6. Jak wykazała analiza metagenomowa w publikacji 4, populacja mikroorganizmów w hodowlach wzbogaconych kultur bakterii anammox jest bardzo złożona. Warto więc zwrócić uwagę na wpływ aktywności innych grup bakterii (*Nitrospira*, heterotroficzne bakterie denitryfikacyjne) na przemiany związków azotu i w konsekwencji mierzoną w oparciu o spadek stężeń azotu

ogólnego wartości SAA. Szczególnie bakterie *Nitrospira* mogą być ciekawym obiektem badań. Najnowsze doniesienia literaturowe (np. O'Shaughnessy, 2015) sugerują, że charakteryzują się one wysokim powinowactwem tlenowym, czyli niskimi wartościami stałej saturacji dla tlenu, dzięki czemu wykazują dużą aktywność przy niskich stężeniach tlenu. W publikacji 4 Kandydat podaje, że stężenie tlenu w reaktorach SBR było utrzymywane na niskim poziomie ($<0,1$ mgO₂/l). Ponadto, słusznie wspomina, że niektóre bakterie z rodzaju *Nitrospira* zawierają pełny zestaw genów umożliwiający utlenianie zarówno amoniaku jak i azotanów (III), co świadczy o ich genetycznym potencjale do prowadzenia procesu pełnej nitrifikacji (tzw. comammox).

7. Zebrana bogata baza empiryczna pozwala na wyjście poza obszar metod statystycznych i wykorzystanie modeli mechanistycznych (biokinetycznych) do badania procesu anammox. Na przykład, wpływ pH można zbadać za pomocą istniejących równań Hultmana i Michaelisa-Antoniou (Lu i wsp., 2017) (Water Sci. Technol., 75, 378-386).

6. Podsumowanie i wniosek końcowy

Rozprawa doktorska Pana mgr. inż. Mariusza Tomaszewskiego pt. „Wspomaganie procesu anammox w niskich temperaturach zredukowanym tlenkiem grafenu” w każdym wymiarze reprezentuje bardzo wysoki poziom. Co istotne, zawiera wyniki oryginalnych i nowatorskich badań, które są już często cytowane w literaturze światowej.

Rozprawa spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) oraz Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. z 2018 r., poz. 261). Co więcej, ze względu na swój poziom i formę zasługuje na miano rozprawy wzorowej.

Dlatego też, wnioskuję o przyjęcie rozprawy przez Radę Wydziału Inżynierii Środowiska i Energetyki i dopuszczenie Pana mgr. inż. Mariusza Tomaszewskiego do dalszych etapów postępowania kwalifikacyjnego o nadanie stopnia doktora nauk technicznych.

Z uwagi na wyjątkowy charakter pracy, wnioskuję też o rozważenie przez Radę Wydziału możliwości wyróżnienia w/w rozprawy.

