dr hab. inż. Agnieszka Cydzik-Kwiatkowska, prof. UWM
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Wydział Nauk o Środowisku
ul. Słoneczna 45 G, 10-719 Olsztyn

Aalborg, 29 lipca 2019 r.

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

1. Podstawa formalna recenzji

Formalną podstawą recenzji jest pismo o sygnaturze RIE-BD/4/512/2018/2019 z dnia 5 lipca 2019 r. od Prodziekan ds. Nauki i Organizacji dr hab. inż. Joanny Kalki, prof. PŚ, informujące, że zostałam powołana na recenzentkę rozprawy doktorskiej pana mgr. inż. Mariusza Tomaszewskiego.

2. Uzasadnienie celowości badań

Szereg zalet procesu anammox, w tym przede wszystkim ograniczenie wydatków energetycznych oczyszczalni ścieków związanych z napowietrzaniem, spowodował, że w ostatnich latach obserwuje się dynamiczny przyrost liczby instalacji w skali technicznej, w których usuwanie azotu ze ścieków jest efektem beztlenowego utleniania amoniaku. Są to jednak głównie oczyszczalnie, do których wprowadzane są ścieki bogate w związki azotu i o korzystnym dla anammox niskim stosunku ChZT/N, jak np. odcieki składowiskowe, wody nadosadowe czy ścieki przemysłowe. Najbardziej pożądanym rozwiązaniem jest wprowadzenie anammox jako technologii oczyszczania ścieków w głównym ciągu technologicznym, co jednak wiąże się z szeregiem ograniczeń związanych z bardzo wolnym przyrostem mikroorganizmów oraz ich wysoką wrażliwością na warunki środowiskowe.

Szczególnie dużym wyzwaniem jest utrzymanie aktywności anammox w warunkach niskich temperatur czyli tak zwany „zimny anammox". Badania wykazały, że możliwa jest poprawa efektywności „zimnego anammoxu" przez zastosowanie czynników fizycznych np.

wibracji, jak też dodatek mikroelementów np. jonów żelaza(II). Bardzo obiecujące były także wyniki badań nad wykorzystaniem nanomateriałów takich jak nanocząstki tlenu niklu(II), maghemitu czy pochodne grafenu. Dodatek zarówno grafenu, jak i zredukowanego tlenku grafenu (RGO), skutkował zwiększeniem szybkości usuwania azotu, jednak badania były prowadzone w zakresie temperatur optymalnym dla bakterii anammox (30-35°C). Z tego względu w badaniach zaprezentowanych w pracy doktorskiej koncentrowano się na możliwości zastosowania RGO w celu zwiększenia efektywności procesu anammox w niższych temperaturach, co umożliwiłoby zastosowanie procesu w głównym ciągu technologicznym oczyszczalni ścieków. Temat rozprawy doktorskiej został wybrany trafnie i wpisuje się w najnowsze trendy badań w dyscyplinie inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka.

3. Ocena pracy

Zgodnie z przepisami określonymi Ustawą z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz.U. z 2017 r. poz. 1789), rozprawa doktorska ma formę jednotematycznego cyklu 4 wieloautorskich publikacji pod wspólnym tytułem „Wspomaganie procesu anammox w niskich temperaturach zredukowanym tlenkiem grafenu". Cykl publikacji obejmuje prace:

1. Tomaszewski M., Cema G., Ziembińska-Buczyńska A. Influence of temperature and pH on the anammox process: A review and meta-analysis. Chemosphere, 182, 203-214, 2017. (Impact Factor 4,427, 35 pkt MNiSW)
2. Tomaszewski M., Cema G., Ziembińska-Buczyńska A. Significance of pH control in anammox process performance at low temperature. Chemosphere, 185, 439-444, 2017. (Impact Factor 4,427, 35 pkt MNiSW).
3. Tomaszewski M., Cema G., Ziembińska-Buczyńska A. Short-term effects of reduced graphene oxide on the anammox biomass activity at low temperatures. Science of The Total Environment, 646, 206-211, 2019. (Impact Factor 4,610, 40 pkt MNiSW).
4. Tomaszewski M., Cema G., Ciesielski S., Łukowiec D., Ziembińska-Buczyńska A. Cold anammox process and reduced graphene oxide - Varieties of effects during long-term interaction. Water Research, 156, 71-81, 2019. (Impact Factor 7,051, 45 pkt MNiSW).

Prace opublikowano w latach 2017-2019. We wszystkich pracach Doktorant jest pierwszym autorem, a jego udział procentowy waha się od 50% do 60% (średnio 55%). Biorąc pod uwagę rangę czasopism, w których opublikowano prace, wysokie udziały procentowe doświadczonych badaczy, głównie promotorów głównego i pomocniczego, były

uzasadnione. Wkład autorski Doktoranta polegał na przeprowadzeniu przeglądu literaturowego, analizie metadanych, opracowaniu metodyk badawczych, zaplanowaniu eksperymentów i ich przeprowadzeniu, analizie, opisie i dyskusji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu. Wszystkie przedstawione prace są indeksowane w Web of Science i posiadają Impact Factor (IF). Sumaryczna wartość IF za 4 publikacje, zgodnie z rokiem ukazania, wynosi 20,515. Sumaryczna wartość IF przypadająca na Doktoranta po uwzględnieniu udziału procentowego w poszczególnych publikacjach wynosi 11,152. Badania były początkowo finansowane z grantu Promotorki Doktoranta, natomiast należy podkreślić, że Doktorantowi również udało się uzyskać finansowanie badań ze środków zewnętrznych w ramach własnego projektu uzyskanego w 2017 roku. Powyżej przedstawione informacje wskazują, że pan mgr. inż. Mariusz Tomaszewski jest w stanie skutecznie aplikować o środki finansowe, zaplanować i przeprowadzić eksperymenty badawcze oraz zinterpretować ich wyniki, co wskazuje na bardzo dobre przygotowanie do pracy badawczej.

Cykl prac badawczych został poprzedzony opisem obejmującym pozycje:

- Streszczenie,
- Abstract,
- Wprowadzenie,
- Teza badawcza, cel i zakres pracy,
- Metodyka i plan badań,
- Podsumowanie,
- Wnioski,
- Proponowane kierunki dalszych badań,
- Literatura.

Doktorant sformułował tezę badawczą, zgodnie z którą efektywność procesu anammox w temperaturach poniżej wartości optymalnej (< 20°C) może być zwiększona poprzez dodatek zredukowanego tlenku grafenu (RGO). Celem pracy była ocena wpływu zredukowanego tlenku grafenu (RGO) na aktywność bakterii anammox w niskich temperaturach (10 - 20°C). Doktorant przyjął następujące cele cząstkowe:

I. określenie wpływu temperatury na aktywność bakterii anammox,

II. określenie wpływu pH na aktywność bakterii anammox w niskich temperaturach,

III. ocena krótkoterminowych efektów wpływu RGO na aktywność bakterii anammox w szerokim zakresie temperatur,

IV. ocena długoterminowych efektów wpływu RGO na efektywność procesu anammox w niskich temperaturach,

V. ocena wpływu RGO na strukturę mikrobiologiczną biocenozy bakteryjnej,

VI. ocena wpływu aktywności mikrobiologicznej na strukturę i właściwości RGO.

Pierwsza z publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej to praca przeglądowa. Obszerny przegląd literaturowy wraz z elementami własnej analizy metadanych stanowi bardzo dobre wprowadzenie do tematu rozprawy i pozwala na wskazanie luk w istniejącym stanie wiedzy, które przeprowadzone badania mają uzupełnić.

W publikacji 2 badano wpływ temperatury i pH w krótkoterminowych testach porcjowych na specyficzną aktywność bakterii anammox (SAA). Badania przeprowadzono przy odczynie 7,5 pH w temperaturach 10, 15, 20, 25, 30, 35 i 40°C oraz w temperaturze 30°C przy odczynie 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 i 9,0 pH. Następnie określono zależność pomiędzy temperaturą (w zakresie 10 - 30°C), pH (6,5 - 8,5) oraz aktywnością bakterii anammox. Analiza regresji przeprowadzona w oparciu o uzyskane wyniki pozwoliła wyznaczyć współczynniki równania wielomianowego drugiego stopnia, opisującego zależność pomiędzy zmiennymi niezależnymi (temperaturą i pH), a zmienną zależną (SAA). Wykazano, że wraz ze spadkiem temperatury zawężał się optymalny zakres pH, który w 10°C wyniósł od 7,7 do 8,0. Uzyskane wyniki wskazywały, że efektywność usuwania azotu w wyniku „zimnego anammoxu" może być istotnie zwiększona dzięki kontroli i korekcie odczynu.

Właściwości nanomateriałów grafenowych są uzależnione od temperatury dlatego w publikacji 3 określano wpływ RGO w stężeniach od 15 do 85 mg/dm^3 na aktywność bakterii anammox w zakresie temperatur od 10 do 30°C. SAA mierzono na podstawie ubytku azotu ogólnego w krótkoterminowych testach porcjowych. Maksymalną, 28% stymulację SAA uzyskano w 13°C, przy stężeniu RGO równym 15 mg/dm^3. Wyższe stężenia powodowały obniżenie SAA o nawet 30% w przypadku zastosowania dawki RGO równej 50 mg/dm^3 w 20°C. Ponieważ zaobserwowano, że wpływ RGO zależy w mniejszym stopniu od stężenia nanomateriału natomiast w większym od jego dawki w przeliczeniu na jednostkę suchej masy organicznej, optymalny zakres stężeń RGO do stymulacji SAA wyznaczono pomiędzy 20 a 45 mg/g s.m.o.. Na podstawie uzyskanych wyników opracowano model opisujący zależność pomiędzy temperaturą, stężeniem RGO, a aktywnością bakterii anammox. Wykazano, że obserwowany efekt stymulacji SAA dodatkiem RGO rośnie wraz ze spadkiem temperatury, co jest bardzo istotną informacją w kontekście wspomagania „zimnego anammox" dodatkiem RGO.

W publikacji 4 opisano kluczowy etap badań dotyczących długoterminowego efektu RGO na efektywność anammox. Badania prowadzono w równolegle eksploatowanych reaktorach porcjowych o objętości 5 dm^3 zasilanych ściekami syntetycznymi o stężeniu azotu

ogólnego w zakresie od 124 do 269 mg N/dm^3 i zaszczepionych osadem anammox. Do jednego z reaktorów dodano RGO w stężeniu 15 mg/dm^3, podczas gdy drugi był reaktorem kontrolnym. Temperatura procesu była stopniowo obniżana z 30 do 10°C. Efektywność anammox określano w oparciu o pomiary azotu amonowego, azotanowego(III) i azotanowego(V). W badaniach długoterminowych udowodniono, że dodatek RGO w stężeniu 15 mg/dm^3 może istotnie zwiększyć efektywność procesu anammox w temperaturze 13°C o około 15-17%. Pozytywny efekt RGO mógł wynikać ze stymulacji wzrostu biomasy (większe znaczenie w temperaturze > 15°C) oraz bezpośredniego wzrostu szybkości reakcji anammox, obserwowanego wyłącznie w temperaturach poniżej 15°C. Poczynione obserwacje potwierdzały istnienie w tym zakresie temperatur „punktu przełomowego" dla metabolizmu bakterii anammox. Sekwencjonowanie metagenomowe oparte o gen kodujący 16S rRNA nie wykazało wpływu RGO na względną liczebność bakterii należących do typu *Planctomycetes*. Zmiany właściwości i struktury RGO przed dodaniem do reaktora i po 109 dniach jego eksploatacji oceniono za pomocą technik mikroskopowych i spektroskopowych. Wykazano oznaki degradacji nanocząstek, zmniejszenie liczby warstw grafenowych, zwiększenie stopnia utlenienia oraz obecność wapnia. Uzyskane wyniki wskazywały, że dwuwartościowe kationy wapnia działają jako łącznik pomiędzy RGO i komórkami mikroorganizmów, co stymulowało ich wzrost. RGO był najprawdopodobniej utleniany przez organiczny mediator, zaangażowany w reakcje biochemiczne. Informacje dotyczące degradacji RDO są szczególnie cenne w świetle rosnącej produkcji nanomateriałów i konieczności ich usuwania podczas oczyszczania ścieków.

W oparciu o wyniki badań sformułowano szereg uzasadnionych wniosków, z których za najistotniejsze uznaję:

- optymalny dla bakterii anammox zakres pH zawęża się wraz ze spadkiem temperatury, co oznacza, że zachowanie optymalnej kondycji zimnego procesu anammox wymaga precyzyjnej kontroli tego parametru,
- zredukowany tlenek grafenu może wspomagać efektywność procesu anammox w niskich temperaturach,
- optymalna dla stymulacji bakterii anammox dawka zredukowanego tlenku grafenu wyznaczona na podstawie testów krótko- i długoterminowych, mieści się w zakresie pomiędzy 19 a 45 mg/g s.m.o.,
- najsilniejsza stymulacja procesu anammox wywołana działaniem zredukowanego tlenku grafenu obserwowana jest w temperaturach poniżej 15°C,

- mikroorganizmy wchodzące w skład badanej biomasy są zdolne do degradacji i modyfikacji struktury zredukowanego tlenku grafenu.

Opis badań kończy rozdział, w którym syntetycznie przedstawione są dalsze plany badawcze, obejmujące między innymi zasilanie reaktora anammox ściekami rzeczywistymi oraz określenie ekotoksyczności grafenu i zredukowanego tlenku grafenu.

W związku z przeprowadzonymi badaniami nasuwa mi się kilka zagadnień, które chcę poddać dyskusji:

- We Wprowadzeniu Doktorant stwierdza, że denitryfikacja jest prowadzona przez „heterotroficzne bakterie beztlenowe" (str. 11), co według mnie nie jest poprawne. Proszę o ustosunkowanie się do uwagi przez zaprezentowanie możliwych szlaków metabolicznych oraz mikroorganizmów prowadzących denitryfikację w zależności od warunków tlenowych.
- We Wprowadzeniu Doktorant używa frazy „proces anoksyczny" w odniesieniu do anammox (str. 11). Zgodnie z danymi literaturowymi, w tym pracami przygotowanymi przez Doktoranta (np. publikacja 1), anammox jest procesem beztlenowego utleniania amoniaku. Można spekulować, że obecność utlenionych form azotu (azotanów(III)), konieczna do prowadzenia procesu, w pewnym stopniu tłumaczy zastosowanie sformułowania „proces anoksyczny" w stosunku do anammox, jednak bezpieczniej będzie się tego ustrzegać.
- W Tabeli 1 (str. 12) Doktorant podaje procentowe wartości redukcji zapotrzebowania na tlen w systemie częściowa nitryfikacja-anammox, które odbiegają od wartości podanych w tekście. Bardzo proszę o wyjaśnienie rozbieżności.
- W publikacji 2 eksperyment dotyczący pH przeprowadzono w temperaturze 30°C. Proszę uzasadnić wybór tej temperatury w kontekście nakierowania badań w pracy doktorskiej na „zimny anammox".
- W badaniach wykorzystywano krótkoterminowe testy porcjowe (ang. batch tests). Jakie jest zdaniem Doktoranta przełożenie wyników uzyskanych w testach porcjowych na eksploatację reaktorów anammox?
- Proszę uzasadnić wybór stężeń azotu ogólnego w zakresie 124 i 269 mg/dm^3 w eksperymencie długoterminowym (praca 4). Dlaczego nie zastosowano wartości charakterystycznych dla ścieków komunalnych?
- W eksperymencie długoterminowym (praca 4) wysokosprawne sekwencjonowanie wykonano dla próbek po 141 dniach od dodania RGO, a badanie RGO wykonano po 109 dniach inkubacji. Jaki jest powód wykonywania badań w różnych momentach eksperymentu a nie na przykład na jego koniec?

- W eksperymencie długoterminowym RGO w postaci pylistej był dodawany w 42 dniu eksploatacji reaktora. Ponieważ HRT w reaktorze był na poziomie 1 doby należy zakładać, że stopniowa wymiana ścieków w reaktorze skutkowała również usuwaniem RGO w miarę upływu czasu. Czy można tym tłumaczyć brak wpływu RGO na zbiorowisko mikroorganizmów, które było badane po 141 dniach od dodania RGO?
- Sformułowanie „liczba bakterii należących do typu Planctomycetes" (str. 28) jest niepoprawne. Zastosowana metodyka badań pozwala jedynie określić udział procentowy sekwencji charakterystycznych dla wybranej grupy mikroorganizmów w odniesieniu do całkowitej liczby uzyskanych sekwencji.
- Jak Doktorant może wyjaśnić przedstawioną w publikacji 4 informację, że w etapie III odnotowano prawie 2-krotnie wyższą szybkość usuwania azotu w porównaniu do etapu VII w tych samych warunkach prowadzenia procesu?
- Niektóre z wniosków są zbyt szczegółowe i mają raczej charakter podsumowania wyników badań (np. wnioski 4 i 5).

Uwagi szczegółowe

Doktorant nie ustrzegł się błędów językowych i edytorskich. Sowo „ponadto" piszemy łącznie (str. 28), w pracy zastosowano niestylistyczne sformułowania np. „podobne wyniki przedstawili Qiao i wsp. [2016], gdzie dodatek..." (str. 18). Nie powinno się używać sformułowania „reaktor SBR" (str. 27), ponieważ skrót SBR zawiera już w sobie słowo „reaktor". W publikacji 4, Tabeli 2 brakuje jednostki. W spisie pozycji literaturowych brakuje Agraval i wsp. 2017 (str. 15), praca Hoekstra i wsp. zgodnie ze spisem literatury została wydana w 2019 roku, a nie 2018, jak zaprezentowano w tekście (str. 15), nie ma jednolitego sposobu prezentacji nazw czasopism naukowych (czasem zastosowane są skróty, czasem pełne nazwy).

Przedstawione uwagi i zastrzeżenia nie umniejszają wartości przedstawionej do oceny dysertacji. Kandydat przeprowadził z sukcesem ambitne badania wskazujące, że dodatek zredukowanego tlenku grafenu pozwala zwiększyć efektywność anammox w niskich temperaturach, jednocześnie prezentując możliwości biodegradacji RGO w systemie oczyszczania ścieków. Warto podkreślić, że pan mgr. inż. Mariusz Tomaszewski posiada dodatkowy dorobek naukowy związany z prezentowaną tematyką badawczą obejmujący 7 prac, z których dwie posiadają Impact Factor (sumaryczny IF = 2,593). W trzech z siedmiu prac Doktorant jest pierwszym autorem. Grono współautorów omawianych prac wskazuje na umiejętność pracy Doktoranta w szerokim zespole badawczym.

4. Wniosek końcowy

Podsumowując recenzję stwierdzam, że przedstawiona dysertacja ma wysoki poziom merytoryczny, jest spójna tematycznie i jednoznacznie wskazuje na umiejętność samodzielnej realizacji badań naukowych przez Doktoranta. Wybrana tematyka wpisuje się w najnowsze trendy w inżynierii środowiska, a uzyskane wyniki mają duży potencjał aplikacyjny. Oceniana rozprawa mgr. inż. Mariusza Tomaszewskiego spełnia wymagania Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki stawiane rozprawom doktorskim. Wnioskuję o dopuszczenie rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego na Wydziale Inżynierii Środowiska i Energetyki Politechniki Śląskiej. Jednocześnie biorąc pod uwagę zakres przeprowadzonych badań i poziom ich publikacji wnioskuję o wyróżnienie rozprawy pana mgr. inż. Mariusza Tomaszewskiego.

Agnieszka Cydzik-Kwiatkowska