



UNIwersytet  
WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ GEOINŻYNIERII

INSTYTUT INŻYNIERII I OCHRONY ŚRODOWISKA

KATEDRA BIOTECHNOLOGII W OCHRONIE ŚRODOWISKA

dr hab. inż. Agnieszka Cydzik-Kwiatkowska, prof. UWM Olsztyn, 26 kwietnia 2021 r.  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
Wydział Geoinżynierii  
ul. Słoneczna 45 G, 10-719 Olsztyn

**Recenzja rozprawy doktorskiej  
mgr inż. Anny Banach-Wiśniewskiej**

**pt. „Zależności ekologiczne bakterii przemian związków azotowych w osadzie czynnym  
sekwencyjnego reaktora biologicznego podczas prowadzenia procesu anammox”**

**1. Podstawa formalna recenzji**

Formalną podstawą recenzji jest pismo o sygnaturze RIE-BD/4/195/2020/2021 z dnia 9 marca 2021 r. od Przewodniczącego Rady Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka Pana prof. dr hab. inż. Andrzeja Rusina, informujące, że zostałam powołana na recenzentkę rozprawy doktorskiej Pani mgr. inż. Anny Banach-Wiśniewskiej.

**2. Uzasadnienie celowości badań**

Szereg zalet procesu anammox, w tym 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.



WYDZIAŁ GEOINŻYNIERII  
INSTYTUT INŻYNIERII I OCHRONY ŚRODOWISKA  
KATEDRA BIOTECHNOLOGII W OCHRONIE ŚRODOWISKA  
UNIwersytet WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE  
ul. Słoneczna 45 G, 10-709 Olsztyn  
tel./fax (89) 523 41 31 kbwos@uwm.edu.pl  
www.wg.uwm.edu.pl



UNIWERSYTET  
WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ GEOINŻYNIERII

INSTYTUT INŻYNIERII I OCHRONY ŚRODOWISKA

KATEDRA BIOTECHNOLOGII W OCHRONIE ŚRODOWISKA

Bakterie anammox charakteryzują się wolnym wzrostem oraz dużą wrażliwością na warunki środowiskowe, co powoduje, że w niesprzyjających warunkach przegrywają w konkurencji z innymi gatunkami biorącymi udział w przemianach azotu w złożonej biocenozie technicznej osadu czynnego lub granul. Dużym wyzwaniem jest utrzymanie wysokiej efektywności anammox w niskich temperaturach, typowych dla głównego ciągu technologicznego oczyszczalni ścieków, które hamują aktywność bakterii anammox w biomacie.

W badaniach zaprezentowanych w pracy doktorskiej koncentrowano się na zbadaniu zależności ekologicznych pomiędzy bakteriami anammox, bakteriami pierwszej i drugiej fazy nityfikacji oraz bakteriami denitryfikacyjnymi biorącymi udział w przemianach związków azotowych podczas oczyszczania ścieków w SBR. Testowano możliwość poprawy efektywności anammox przez zastosowanie unieruchomienia bakterii anammox w nośnikach z alginianu sodu z dodatkiem zredukowanego tlenku grafenu oraz w nośnikach z alginianu sodu i alkoholu poliwinylowego. Efektywność usuwania związków azotu i interakcje pomiędzy grupami mikroorganizmów w nośnikach były badane między innymi w 15°C, czyli w temperaturze zbliżonej do temperatury w głównym ciągu 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 „Zależności ekologiczne bakterii przemian związków azotowych w osadzie czynnym sekwencyjnego reaktora biologicznego podczas prowadzenia procesu anammox”. Cykl publikacji obejmuje prace:



WYDZIAŁ GEOINŻYNIERII  
INSTYTUT INŻYNIERII I OCHRONY ŚRODOWISKA  
KATEDRA BIOTECHNOLOGII W OCHRONIE ŚRODOWISKA  
UNIWERSYTET WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE  
ul. Słoneczna 45 G, 10-709 Olsztyn  
tel./fax (89) 523 41 31 kbwos@uwm.edu.pl  
www.wg.uwm.edu.pl



UNIWERSYTET  
WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ GEOINŻYNIERII

INSTYTUT INŻYNIERII I OCHRONY ŚRODOWISKA

KATEDRA BIOTECHNOLOGII W OCHRONIE ŚRODOWISKA

1. Ecophysiology and dynamics of nitrogen removal bacteria in a sequencing batch reactor during wastewater treatment start-up. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(8), 4215-4222, 2019 (Impact Factor 2.540, 70 pkt MNiSW)
2. Medium shift influence on nitrogen removal bacteria: Ecophysiology and anammox process performance *Chemosphere* 238, 124597, 2020 (Impact Factor 5.778, 100 pkt MNiSW)
3. Effect of biomass immobilization and reduced graphene oxide on the microbial community changes and nitrogen removal at low temperatures. *Scientific Reports*, 11, 840, 2021 (Impact Factor 4.120, 140 pkt MNiSW).
4. Effect of temperature shifts and anammox biomass immobilization on sequencing batch reactor performance and bacterial genes abundance *International Journal of Environmental Science and Technology*, 1-12, 2020 (Impact Factor 2.540, 70 pkt MNiSW).

Prace opublikowano w latach 2019-2020. W pierwszej pracy Doktorantka jest drugim autorem z udziałem procentowym równym 40%, w kolejnych pracach jest pierwszym autorem z udziałem procentowym na poziomie 65%-70%. Analiza prac wskazuje na rozwój naukowy Doktorantki, przejawiający się zwiększeniem roli w opracowaniu koncepcji i przeprowadzeniu badań. Wzbogaceniu ulega także warsztat badawczy. Wszystkie przedstawione prace są indeksowane w Web of Science i posiadają Impact Factor (IF). Sumaryczna wartość IF przedstawionych prac, zgodnie z rokiem ukazania, wynosi 14,978.

Badania były początkowo finansowane z grantu Promotorki Doktorantki, natomiast należy podkreślić, że Doktorantce udało się uzyskać finansowanie badań ze środków zewnętrznych w ramach własnego projektu uzyskanego w 2016 roku. Powyżej przedstawione informacje wskazują, że Pani mgr. inż. Anna Banach-Wiśniewska 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,



WYDZIAŁ GEOINŻYNIERII  
INSTYTUT INŻYNIERII I OCHRONY ŚRODOWISKA  
KATEDRA BIOTECHNOLOGII W OCHRONIE ŚRODOWISKA  
UNIWERSYTET WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE  
ul. Słoneczna 45 G, 10-709 Olsztyn  
tel./fax (89) 523 41 31 kbwos@uwm.edu.pl  
www.wg.uwm.edu.pl



UNIwersytet  
WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ GEOINŻYNIERII

INSTYTUT INŻYNIERII I OCHRONY ŚRODOWISKA

KATEDRA BIOTECHNOLOGII W OCHRONIE ŚRODOWISKA

- Teza badawcza, cel i zakres pracy,
- Metodyka badań,
- Wyniki badań,
- Wnioski,
- Literatura,
- Wykaz rysunków
- Wykaz tabel.

Następnie zostały zestawione publikacje będące podstawą pracy doktorskiej wraz z oświadczeniami autorów o udziale procentowym w przygotowaniu publikacji oraz dorobkiem wspierającym.

Doktorantka sformułowała tezę badawczą, zgodnie z którą niezależnie od konfiguracji sekwencyjnych reaktorów biologicznych i panujących w nich warunków środowiskowych, bakterie anammox współgospodują z innymi grupami bakterii przemian związków azotowych i wykazują wzajemne powiązania ekologiczne, niezbędne do prawidłowego funkcjonowania ekosystemu

Doktorantka przyjęła następujące cele cząstkowe:

- I. monitorowanie gatunków i genotypów dominujących oraz względnej liczby genów adaptacyjnych bakterii przemian azotowych w zależności od parametrów prowadzenia procesu anammox w SBR,
- II. badanie rozmieszczenia przestrzennego poszczególnych grup bakterii przemian związków azotowych w osadzie czynnym,
- III. badanie zdolności adaptacyjnych bakterii anammox,
- IV. monitorowanie zmian w liczebności i aktywności poszczególnych grup bakterii przemian związków azotowych podczas wpracowywania procesu anammox w SBR,
- V. zbadanie efektu zmiany pożywki, z ścieków syntetycznych na rzeczywiste ścieki - odcieki składowiskowe, na dynamikę bakterii przemian związków azotowych w SBR,



WYDZIAŁ GEOINŻYNIERII  
INSTYTUT INŻYNIERII I OCHRONY ŚRODOWISKA  
KATEDRA BIOTECHNOLOGII W OCHRONIE ŚRODOWISKA  
UNIwersytet WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE  
ul. Słoneczna 45 G, 10-709 Olsztyn  
tel./fax (89) 523 41 31      kbwos@uwm.edu.pl  
www.wg.uwm.edu.pl



UNIwersytet  
WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ GEOINŻYNIERII

INSTYTUT INŻYNIERII I OCHRONY ŚRODOWISKA

KATEDRA BIOTECHNOLOGII W OCHRONIE ŚRODOWISKA

VI. zbadanie efektu zastosowania immobilizacji w nośnikach żelowych na prowadzenie procesu anammox w niskiej temperaturze i zbiornisko bakteryjne immobilizowanego osadu czynnego.

W pierwszej z prac badania prowadzono w sekwencyjnym reaktorze biologicznym, w którym dobór parametrów eksploatacyjnych oraz skład pożywki faworyzował wzrost bakterii anammox. Do badań zbiorniska mikroorganizmów wykorzystano qPCR i FISH. Ultrastrukturę komórkową bakterii anammox badano transmisyjną mikroskopią elektronową. Po ponad 20 dniach badań osiągnięto stabilne usunięcie azotu na poziomie  $0,310 \text{ kg N}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$  przy obciążeniu reaktora ładunkiem azotu  $0,340 \pm 0,031 \text{ kg N}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ . Analizy molekularne wykazały współwystępowanie bakterii przemian związków azotowych w biomacie. W kłaczkach osadu bakterie anammox znajdowały się w sąsiedztwie AOB, co mogło wskazywać, że AOB pełnią funkcję ochronną dla bakterii anammox, konsumując tlen i dostarczając azotanów(III).

W drugiej publikacji, do stabilnie pracującego SBR z biomasą anammox, po okresie dozowania ścieków syntetycznych nie zawierających węgla organicznego, rozpoczęto dozowanie odcieków składowiskowych, zawierających organiczne związki węglowe. Dozowanie odcieków skutkowało wzrostem udziału bakterii denitryfikacyjnych w biomacie, jednak bakterie anammox pozostały najliczniej reprezentowaną grupą mikroorganizmów w SBR. Analizy molekularne oraz fizyko-chemiczne wykazały, że adaptacja zbiorniska bakterii anammox nastąpiła po 90 dniach eksploatacji układu technologicznego. Zmiana w zbiornisku była trwała – powrót do dozowania ścieków syntetycznych nie spowodował powrotu do aktywności i struktury gatunkowej obserwowanej na początku eksperymentu.

W badaniach w trzeciej i czwartej publikacji testowano możliwość utrzymania wysokiej aktywności anammox w niskich temperaturach przez unieruchomienie mikroorganizmów w nośnikach. W pracach charakteryzowano właściwości wodne, morfologię i strukturę nośników.

W trzeciej publikacji wspomagano proces anammox przez immobilizację mikroorganizmów w alginianie sodu oraz zastosowanie RGO. Badania prowadzono



WYDZIAŁ GEOINŻYNIERII  
INSTYTUT INŻYNIERII I OCHRONY ŚRODOWISKA  
KATEDRA BIOTECHNOLOGII W OCHRONIE ŚRODOWISKA  
UNIwersytet WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE  
ul. Słoneczna 45 G, 10-709 Olsztyn  
tel./fax (89) 523 41 31 kbwos@uwm.edu.pl  
www.wg.uwm.edu.pl



UNIwersytet  
WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ GEOINŻYNIERII

INSTYTUT INŻYNIERII I OCHRONY ŚRODOWISKA

KATEDRA BIOTECHNOLOGII W OCHRONIE ŚRODOWISKA

początkowo w temperaturze 23°C, by następnie obniżyć temperaturę do 15°C, czyli temperatury zbliżonej do średniej temperatury ścieków wpływających do głównego ciągu oczyszczania ścieków. W badaniach molekularnych wykorzystano oprócz qPCR nakierowanej na geny funkcyjne, również sekwencjonowanie nowej generacji. Dodatek RGO do alginianu sodu zwiększał stabilność i wytrzymałość mechaniczną nośników. Obserwowano, że bakterie wykorzystywały alginian jako źródło węgla organicznego, co skutkowało degradacją nośników na koniec eksperymentu. Badania struktury mikrobiologicznej wskazały na pojawienie się w biomacie takich denitryfikatorów jak *Flavobacterium denitrificans* czy *Denitrobacter* sp.

W czwartej publikacji badania prowadzono przez 3 miesiące w dwóch SBR zasilanych pożywką syntetyczną o składzie sprzyjającym wzrostowi bakterii anammox. SBR eksploatowano w temperaturze 30°C, 23°C oraz 15°C przy hydraulicznym czasie zatrzymania równym 24 h. Jeden z SBR był reaktorem kontrolnym, natomiast w drugim biomasa była unieruchomiona w nośnikach z alginianem sodu i alkoholu poliwinylowego.

W obu pracach obserwowano, że zarówno zmiana temperatury, jak i immobilizacja, istotnie wpływały na efektywność usuwania azotu. Skład ścieków oczyszczonych wskazywał, że w niższych temperaturach wzrastała rola nitryfikacji w przemianach związków azotowych oraz, że immobilizacja biomasy sprzyjała stabilności procesu. W reaktorze z biomasą unieruchomioną w alginianie sodu i alkoholu poliwinylowym stosunki molowe form azotu w odpływie z reaktora były bliskie stechiometrii procesu anammox. Nośniki z dodatkiem alkoholu poliwinylowego były dodatkowo bardziej odporne na biodegradację w porównaniu z nośnikami z alginianu sodu, co odzwierciedlało się w obniżeniu roli denitryfikacji w oczyszczaniu ścieków. W biomacie występowały wszystkie badane grupy mikroorganizmów biorące udział w przemianach związków azotu. W reaktorach z biomasą immobilizowaną udział bakterii anammox, szacowany w oparciu o analizę genu *hzs*, był najwyższy i malał wraz z obniżaniem temperatury w SBR. Notowano negatywną korelację pomiędzy liczebnością w biomacie bakterii denitryfikacyjnych oraz bakterii anammox.

Badania podsumowano stwierdzeniem, że immobilizacja wydaje się jednym z możliwych sposobów prowadzenia procesu anammox w niższych temperaturach, jednak dla



WYDZIAŁ GEOINŻYNIERII  
INSTYTUT INŻYNIERII I OCHRONY ŚRODOWISKA  
KATEDRA BIOTECHNOLOGII W OCHRONIE ŚRODOWISKA  
UNIwersytet WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE  
ul. Słoneczna 45 G, 10-709 Olsztyn  
tel./fax (89) 523 41 31 kbwos@uwm.edu.pl  
www.wg.uwm.edu.pl



efektywności procesu kluczowe jest dobranie właściwego nośnika dla określonego rodzaju biomasy.

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

- bakterie przemian związków azotowych współwystępują w osadzie czynnym z sekwencyjnych reaktorów biologicznych, w których prowadzony jest anammox; proporcje występowania nityfikatorów, denityfikatorów i bakterii anammox zależą od parametrów eksploatacji SBR,
- zmiana warunków środowiskowych może zmniejszyć liczbę dostępnych nisz ekologicznych i licznosc bakterii anammox nie powodując jednak spadku ich aktywności i efektywności procesu,
- liczba kopii genu *hzo* specyficznego dla bakterii anammox jest często skorelowana z liczbą kopii genów kodujących enzymy uczestniczące w procesie denityfikacji: *nirS* i *nirK*, co świadczy o wzajemnych relacjach bakterii anammox i bakterii denityfikacyjnych w badanych układach,
- immobilizacja biomasy może mieć ochronne właściwości dla bakterii anammox podczas prowadzenia procesu w temperaturach zbliżonych do temperatur ścieków głównego ciągu oczyszczania,
- pomimo dodatku zredukowanego tlenu grafenu do nośników alginianowych, jako substancji mającej wspomagać efektywnosc procesu anammox, nośniki SA-RGO okazały się być mniej odporne na biodegradację niż nośniki z alginianu sodu i alkoholu poliwinylowego.

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

- Jak można uzasadnić brak widocznego pogorszenia efektywności anammox w warunkach dozowania do SBR odcieków składowiskach, zawierających organiczne związki węgla, w tym łatworozkładalne?
- Czy, zdaniem Doktorantki, dodatek RGO potencjalnie wspomagał proces anammox, jak stwierdzono w Wynikach, czy raczej przyczyniał się jedynie do poprawy właściwości







mechanicznych nośników z alginianu sodu? Czy możliwe jest wskazanie zmian w biocenozie wynikających z obecności RGO w SBR?

- W jaki sposób immobilizacja w nośniku z alginianu sodu oraz zmiana substratu z pożywki syntetycznej na odcieki składowiskowe wpływały na zróżnicowanie gatunkowe mikroorganizmów w biomacie? Czy istniała zależność między bogactwem gatunkowym biocenozy, a efektywnością i stabilnością usuwania azotu w SBR?

- Jakie nośniki syntetyczne, zdaniem Doktorantki, można zaproponować do badań nad immobilizacją bakterii anammox by ograniczyć biodegradację nośników przez bakterie?

- Na ile jest możliwe zastosowanie nośników z immobilizowanymi bakteriami anammox w głównym ciągu technologicznym - jakie są głównie ograniczenia tego typu podejścia w skali technicznej?

#### *Uwagi szczegółowe*

Nie powinno się używać sformułowania „reaktor SBR” (np. str. 27), ponieważ skrót SBR zawiera już w sobie słowo „reaktor”. Analogiczna zasada dotyczy zwrotu „reakcja PCR” (str. 20). Przyjętym rozwinięciem skrótu PCR-DGGE jest łańcuchowa reakcja polimerazy z elektroforezą w gradiencie czynnika denaturującego. Skróty nazw enzymów zapisujemy wielkimi literami. W cytowaniu literatury zamiast „et al.” powinno być użyte „i in.” Na wykresach nie należy łączyć pojedynczych punktów pomiarowych, bo sugeruje to ciągłość wykonywanych pomiarów. Przedstawione uwagi i zastrzeżenia nie umniejszają wartości przedstawionej do oceny dysertacji.

Doktorantka przeprowadziła z sukcesem wartościowe badania wskazujące, że bakterie przemian związków azotowych współwystępują w SBR oraz, że immobilizacja, w szczególności w nośnikach z alginianu sodu i alkoholu poliwinylowego, poprawia stabilność i efektywność anammox w niskich temperaturach, co może stanowić podstawę szerszej aplikacji procesu w głównym ciągu oczyszczalni ścieków.







UNIwersytet  
WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ GEOINŻYNIERII

INSTYTUT INŻYNIERII I OCHRONY ŚRODOWISKA

KATEDRA BIOTECHNOLOGII W OCHRONIE ŚRODOWISKA

Pani mgr. inż. Anna Banach-Wiśniewska posiada dodatkowy dorobek naukowy związany z prezentowaną tematyką badawczą obejmujący 6 prac, z których trzy posiadają Impact Factor. W czterech pracach Doktorantka jest pierwszym autorem.

#### 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 Doktorantkę. Wybrana tematyka wpisuje się w najnowsze trendy w inżynierii środowiska, a uzyskane wyniki mają duży potencjał aplikacyjny. Oceniana rozprawa mgr. inż. Anny Banach-Wiśniewskiej 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. Wniosuję 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, wniosuję o wyróżnienie rozprawy Pani mgr. inż. Anny Banach-Wiśniewskiej.

*Hgniewka Cydzik-Kwiatkowska*



WYDZIAŁ GEOINŻYNIERII  
INSTYTUT INŻYNIERII I OCHRONY ŚRODOWISKA  
KATEDRA BIOTECHNOLOGII W OCHRONIE ŚRODOWISKA  
UNIwersytet WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE  
ul. Słoneczna 45 G, 10-709 Olsztyn  
tel./fax (89) 523 41 31 kbwos@uwm.edu.pl  
www.wg.uwm.edu.pl