

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. ANNY BANACH-WIŚNIEWSKIEJ

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

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Anny Banach-Wiśniewskiej została napisana pod kierunkiem Pani dr hab. Aleksandry Ziemińskiej-Buczyńskiej, będącej pracownikiem Katedry Biotechnologii Środowiskowej na Wydziale Inżynierii Środowiska i Energetyki Politechniki Śląskiej.

Pracę poświęcono nowatorskim badaniom nad określeniem zależności ekologicznych bakterii przemian związków azotowych w osadzie czynnym sekwencyjnych reaktorów biologicznych (SBR). Stanowi ona ogromny wkład w badania procesów oczyszczania ścieków z udziałem bakterii anammox, nityfikacyjnych i denityfikacyjnych.

1. Znaczenie i aktualność zagadnień zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej

Związki azotu obecne w ściekach bytowo-gospodarczych, przemysłowych i rolniczych są powodem eutrofizacji ekosystemów słodkowodnych i morskich, a tym samym rozwoju toksycznych zakwitów glonów i często wykluczenia dotkniętej tym zjawiskiem wody słodkiej z zasobów wody pitnej. Obniżenie ilości azotu odprowadzanego w ściekach oczyszczonych do środowiska jest jednym z najważniejszych zadań oczyszczalni ścieków. Z reguły ilość azotanów (III) i (V) w ściekach dopływających do oczyszczalni jest niewielka, a azot występuje w nich najczęściej w formie amoniaku oraz organicznych związków azotu. Te ostatnie podlegają jeszcze w sieci kanalizacyjnej biologicznemu przekształceniu do amoniaku i soli amonowych. Najczęściej do usuwania azotu metodami biologicznymi w oczyszczalniach ścieków wykorzystuje się osad czynny w reaktorach biologicznych. W klasycznym układzie związki amonowe są tam utleniane przez bakterie nityfikacyjne do azotanów (III) i (V), a te redukowane są przez bakterie denityfikacyjne do azotu cząsteczkowego i w postaci gazu usuwane z układu do atmosfery. Usprawnienie procesu

usuwania związków azotu ze ścieków uzyskuje się m.in. poprzez skrócenie procesu nityfikacji. Ma to miejsce w procesie anammox, realizowanym przez bakterie z rzędu *Planctomycetales*, w którym w warunkach tlenowych azot amonowy zostaje częściowo utleniony do azotanów (III), a te w warunkach beztlenowych są redukowane podczas utleniania amoniaku do azotu cząsteczkowego. Należy jednak pamiętać, że przemiany związków azotu w osadzie czynnym zachodzą przy udziale koegzystujących tam bakterii nityfikacyjnych, denityfikacyjnych oraz anammox. Tymczasem wiedza o ekofizjologii bakterii przemian związków azotowych i adaptacji poszczególnych ich grup do zmieniających się warunków środowiskowych jest ciągle bardzo ograniczona, gdyż dotychczasowe badania nad przemianami związków azotowych skupiały się na mechanizmach reakcji, parametrach i optymalizacji procesów technologicznych.

Badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej mgr inż. Anny Banach-Wiśniewskiej stanowią odpowiedź na realne zagrożenie wynikające z zanieczyszczenia środowiska nadmiernymi ładunkami związków azotu. Spośród szeregu procesów transformacji związków azotowych Doktorantka skoncentrowała swoją uwagę na procesie anammox, który uważa się za najbardziej ekonomiczny i przyjazny środowisku proces wykorzystywany w oczyszczaniu ścieków. Warto zwrócić uwagę, że poznanie zależności ekologicznych pomiędzy poszczególnymi grupami bakterii przemian związków azotowych podczas procesu anammox prowadzonego w reaktorach SBR jest niezwykle ważne zarówno w kontekście badań podstawowych, jak i aplikacyjnych. Stąd też badania zaprezentowane w przedłożonej do oceny rozprawie doktorskiej są niezwykle ważne i posiadają wiele elementów nowości naukowej.

2. Ocena formalna pracy doktorskiej

Głównym problemem badawczym, który został podjęty przez Doktorantkę, było określenie zależności ekologicznych bakterii anammox, denityfikacyjnych oraz nityfikacyjnych w osadzie czynnym sekwencyjnego reaktora biologicznego. Praca doktorska Pani mgr inż. Anny Banach-Wiśniewskiej została zrealizowana i przedstawiona w czterech spójnych tematycznie pracach doświadczalnych opublikowanych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej:

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 (IF=2,54; MEiN=70)

2. Medium shift influence on nitrogen removal bacteria: Ecophysiology and anammox process performance, *Chemosphere*, 238, 124597, 2020 (IF=5,778; MEiN=100)
3. Effect of biomass immobilization and reduced grapheme oxide on the microbial community changes and nitrogen removal at low temperatures. *Scientific Reports*, 11, 840, 2021 (IF=4,12; MEiN=140)
4. Effect of temperature shifts and anammox biomas immobilization on sequencing batch reactor performance and bacterial genes abundance. *International Journal of Environmental Science and Technology*, doi: 10.1007/s13762-020-02957-w, 2020 (IF=2,54; MEiN=70)

W trzech z czterech prac badawczych wchodzących w skład rozprawy Doktorantka jest pierwszym autorem, co zwykle odpowiada roli osoby wykonującej większość badań laboratoryjnych, zaś łączny IF prac wynosi 14,978 (380 punktów wg. listy MEiN). Uważam, że jak na pracę doktorską wkład ten jest bardzo wysoki. Warto w tym miejscu nadmienić, iż zamieszczone w rozprawie prace nie są jedynymi, które Doktorantka posiada w swoim dorobku publikacyjnym. Praca doktorska została zrealizowana w ramach projektów badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki (2013/09/D/NZ9/02438; 2016/23/N/NZ9/02147) oraz Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki Politechniki Śląskiej (BKM-554/RIE-8/2018), a dwie prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej są efektem współpracy Doktorantki z dr hab. Izabela Poprawą z Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach oraz dr. Mohammed S Hellad z Narodowego Centrum Badań w Kairze (Egipt).

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej poprzedzają streszczenia w języku polskim i angielskim, rozdział, w którym Doktorantka opisuje aktualny stan wiedzy w zakresie podjętego tematu badawczego, a następnie główne cele i zarys pracy, na który składają się metodyka badań, wyniki oraz wnioski, które potwierdzają że Doktorantka jest już ukształtowanym i dojrzałym młodym naukowcem. Na kolejnych stronach Doktorantka przedstawiła spis najważniejszych i aktualnych źródeł literaturowych dotyczących danego tematu oraz spis rysunków i tabel. W połączeniu z 4 artykułami naukowymi doktorat liczy 91 stron. Dodatkowo na kolejnych 23 stronach zamieszczono stosowne oświadczenia współautorów oraz dorobek wspierający Doktorantki. Dojrzałość naukowa, którą Doktorantka wykazała się podczas przygotowania rozprawy, jak i sama oprawa edytorska pracy zasługują na uznanie.

3. Wyniki pracy doktorskiej i ich znaczenie

W przypadku prac doktorskich, których wyniki zostały już opublikowane, najlepszym potwierdzeniem ich wartości i znaczenia jest ich cytowalność w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Prace mgr inż. Anny Banach-Wśniewskiej i jej promotora dr hab. Aleksandry Ziemińskiej-Buczyńskiej, mają 5 cytowań, co wynika z faktu, iż zostały opublikowane niedawno (2019-2021). Zważywszy na podejmowany w nich aktualny problem badawczy i opisywane wyniki można z dużym prawdopodobieństwem stwierdzić, że liczba cytowań w niedalekim czasie znacznie wzrośnie. Stąd też, w swojej recenzji chciałabym wymienić jedynie wybrane osiągnięcia uzyskane przez Doktorantkę podczas realizacji zadań badawczych, które uważam za najważniejsze:

- zastosowanie kompleksowych i zaawansowanych metod badawczych, które umożliwiły wykazanie, że parametry fizykochemiczne wpływają na proporcje szczepów nityfikacyjnych, denityfikacyjnych oraz anammox w sekwencyjnych reaktorach biologicznych, jednak nie eliminują z układu żadnej z tych grup;
- zidentyfikowanie korelacji pomiędzy liczbą kopii genu oksydoreduktazy hydrazyny bakterii anammox a liczbą kopii genów kodujących reduktazę azotynową bakterii denityfikacyjnych, świadczące o wzajemnych relacjach pomiędzy tymi grupami bakterii;
- wykazanie, że immobilizacja bakterii przemian związków azotowych umożliwia prowadzenie procesu anammox w temperaturach zbliżonych do temperatur ścieków głównego ciągu oczyszczania.

Analiza pracy doktorskiej mgr inż. Anny Banach-Wśniewskiej pozwala stwierdzić, że Doktorantka odnalazła swoją niszę badawczą, a zrealizowane przez nią badania będą interesujące dla wielu naukowców zajmujących się mikrobiologicznymi przemianami związków azotu.

4. Uwagi

Nie mam uwag krytycznych do recenzowanej pracy, zaś wymienione poniżej punkty mają formę sugestii lub mogą stanowić początek dyskusji w trakcie obrony pracy doktorskiej.

4.1 W rozdziale 1.1 (str. 12) Doktorantka pisze: „Występowanie związanych z błoną cząstek zawierających enzymy jest ogólną cechą wszystkich bakterii utleniających azotany (III) [...]”.

Proszę o doprecyzowanie sformułowania „cząstki”, czym są te cząstki?

- 4.2** W publikacji nr 2 rozprawy doktorskiej napisano, że do układu badawczego wprowadzano ścieki rzeczywiste – odcieki składowiskowe. Jaki był skład tych odcieków, jakie związki stanowiły główne zanieczyszczenia?
- 4.3** Z rysunku nr 1 w publikacji nr 2 wynika, że w około 30 dniu prowadzenia eksperymentu w sekwencyjnym reaktorze biologicznym stwierdzono gwałtowny spadek wydajności w usuwaniu azotu, z jednoczesnym wzrostem stężenia azotu w wypływie z bioreaktora. Czy Doktorantka ma jakieś przypuszczenia, z czego mogło wynikać takie gwałtowne załamanie układu?
- 4.4** We wstępie publikacji nr 3 Doktorantka pisze, że aktywność bakterii anammox w niskich temperaturach może być zwiększona poprzez dodanie zredukowanego tlenu grafenu. Bardzo proszę o przybliżenie tematu i wyjaśnienie podstaw tego zjawiska.
- 4.5** W publikacji nr 3 (podrozdział Preparation of the carriers) podano, że roztwór alginianu ze zredukowanym tlenkiem grafenu mieszano z biomasą w stosunku 1:2 (v/v). Czy taki sam stosunek biomasy do nośnika zastosowano w układzie z samym alginianem? Nie znalazłam tej informacji w publikacji. W pracy porównywano procesy usuwania azotu przez bakterie przemian związków azotowych zaimmobilizowanych na dwóch nośnikach. Wiadomym jest, że różne właściwości nośników mogą wpływać na wydajność procesu immobilizacji biomasy. Czy Doktorantka określała wydajność pułapkowania biomasy w obu nośnikach?
- 4.6** W publikacji nr 3, na rysunku nr 2 przedstawiono zdjęcia z mikroskopu skaningowego. Czy zdjęcia powierzchni kulek z alginianu i alginianu ze zredukowanym tlenkiem grafenu z zaimmobilizowaną biomasą oraz powierzchni kulek kontrolnych bez biomasy wykonywano w tym samym powiększeniu? Jeżeli tak, to z czego według Doktorantki wynikają takie duże różnice w strukturze powierzchni tych kulek (porównanie pomiędzy kulkami z biomasą i kontrolnymi)? Na jakim etapie badań wykonywano zdjęcia kulek z zaimmobilizowaną biomasą? Czy są to kulki z czasu 0 czy późniejszego etapu hodowli? Ciekawym byłoby porównanie stanu zasiedlenia nośników przez bakterie w różnych etapach pracy reaktora SBR.
- 4.7** W publikacji nr 3, analiza zdjęć z mikroskopu skaningowego wykazała, że powierzchnia kulek z alginianu ze zredukowanym tlenkiem grafenu charakteryzuje się mniejszą ilością porów i bardziej gładką powierzchnią w porównaniu do powierzchni kulek z samego

alginianu. W pracy podsumowano, że wydajność usuwania azotu była lepsza w układach z zaimmobilizowaną biomasą niż w hodowlach z wolnymi komórkami. Nie znalazłam natomiast informacji, który z immobilizowanych układów Doktorantka uznała za lepszy w usuwaniu związków azotu. Proszę o wskazanie takiego układu i powiązanie uzyskanych wyników z charakterystyką struktury powierzchni obu nośników.

- 4.8** W publikacji nr 4 izolowano DNA z biomasy, nie opisano jednak jak przebiega procedura izolacji DNA z komórek immobilizowanych w nośniku. Bardzo proszę Doktorantkę o przedstawienie tej procedury.
- 4.9** W publikacji nr 4 badano absorpcję błękitu metylenowego przez kulki alginianowe modyfikowane alkoholem poliwinylowym. Zdolność absorpcji barwnika przez nośnik jest bezpośrednio skorelowana z dyfuzją substratów. W pracy badano absorpcję barwnika przez kulki o stosunkach 2% do 2,5%; 2% do 5%; 2% do 10% oraz 2% do 15%, odpowiednio alginianu sodu i alkoholu poliwinylowego. Jednak w badaniach nad wydajnością usuwania azotu przez zaimmobilizowaną biomasę zastosowano nośnik o stosunku alginianu do alkoholu poliwinylowego wynoszącym 2% do 7%. Skąd taki stosunek składników nośnika? Dlaczego Doktorantka nie zastosowała nośnika o składzie, dla którego stwierdzono najlepszą absorpcję błękitu metylenowego?
- 4.10** W literaturze bardzo szeroko opisuje się badania nad zastosowaniem immobilizowanych mikroorganizmów w degradacji szerokiej gamy związków. Większość badań ograniczona jest jednak do skali laboratoryjnej. Czy Doktorantce znane są przykłady implementacji immobilizowanych mikroorganizmów do rzeczywistych układów oczyszczalni ścieków?
- 4.11** W podsumowaniu rozprawy doktorskiej zabrakło mi informacji o dalszych planach badawczych Doktorantki. Bardzo proszę o rozwinięcie tego tematu.

5. Wnioski

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr inż. Anny Banach-Wiśniewskiej napisana została w oparciu o cztery prace naukowe opublikowane w latach 2019-2021 i przedstawia szeroko zakrojone wyniki badań, które zostały przez Doktorantkę bardzo wnikliwie przeanalizowane w oparciu o dostępną literaturę naukową, co wpływa na jej ogólny bardzo wysoki poziom merytoryczny. Liczba moich uwag/sugestii jest niewielka i nie wpływa na ogólną **bardzo dobrą**

ocenę pracy. Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Anny Banach-Wiśniewskiej spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 31 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz. U z 2017 r., poz. 1789) także w art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę, które stanowią, że przewody doktorskie, (...), wszczęte i niezakończone przed dniem wejścia w życie ustawy, o której mowa w art. 1, są przeprowadzane na zasadach dotychczasowych, z tym że jeżeli nadanie stopnia doktora, (...), następuje po dniu 30 kwietnia 2019 r. stopień (...) nadaje się w dziedzinach i dyscyplinach określonych w przepisach wydanych na podstawie art. 5 ust. 3 tej ustawy, i wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Anny Banach-Wiśniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zwracam się również do Rady Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka Politechniki Śląskiej o **wyróżnienie pracy doktorskiej mgr inż. Anny Banach-Wiśniewskiej** ze względu na jej wysoki poziom naukowy.



dr hab. Urszula Guzik, prof. UŚ