



Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki
Katedra Biotechnologii Środowiskowej

OBSZERNE STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**Wspomaganie procesu anammox w niskich temperaturach
zredukowanym tlenkiem grafenu**

*Supporting the anammox process at low temperatures
by reduced graphene oxide*

mgr inż. Mariusz Tomaszewski

Promotor:

dr hab. Aleksandra Ziemińska-Buczyńska, prof. Pol. Śl.

Promotor pomocniczy:

dr inż. Grzegorz Cema

Gliwice 2019

Badania finansowano przez Narodowe Centrum Nauki, w ramach projektów numer
UMO-2013/09/D/NZ9/02438 i UMO-2017/25/N/NZ9/01159

oraz przez Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki Politechniki Śląskiej,
w ramach projektu numer BKM 560/RIE8/2016

SPIS TREŚCI

1.	WPROWADZENIE	4
1.1.	Proces anammox	4
1.2.	Zastosowanie procesu anammox	6
1.3.	Proces anammox w niskich temperaturach	7
1.4.	Wspomaganie procesu anammox za pomocą nanomateriałów	9
2.	TEZA BADAWCZA, CEL I ZAKRES PRACY	12
3.	METODYKA I PLAN BADAŃ	13
3.1.	Cele cząstkowe I i II	13
3.2.	Cel cząstkowy III	14
3.3.	Cele cząstkowe IV, V i VI	15
4.	PODSUMOWANIE	17
5.	WNIOSKI	22
	LITERATURA	23
6.	PUBLIKACJE BĘDĄCE PODSTAWĄ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	28

1. WPROWADZENIE

Ochrona zasobów wodnych to jedno z najważniejszych wyzwań współczesnego świata, a zabezpieczenie ich przed zanieczyszczeniami pochodzenia antropogenicznego to główne zadanie każdej oczyszczalni ścieków. Podstawowym zagrożeniem dla ekosystemów wodnych są wywołujące eutrofizację pierwiastki biogenne, wśród których jednym z dwóch najważniejszych jest azot. Do najbardziej przyjaznych środowisku i rozpowszechnionych metod oczyszczania ścieków należą metody biologiczne. Aktualnie w większości tych systemów do usuwania związków azotu wykorzystuje się połączenie dwóch procesów: nityfikacji, w czasie której azot amonowy utleniany jest do azotanów (III), a następnie azotanów (V) oraz denityfikacji, podczas której azotany (V) redukowane są do azotu cząsteczkowego. Pierwszy z tych procesów prowadzony jest przez grupę chemolitoautotroficznych bakterii tlenowych, a drugi przez heterotroficzne bakterie beztlenowe. Ze względu na tlenowy charakter pierwszego z procesów wymagane jest napowietrzanie reaktorów biologicznych, w których ten proces zachodzi. Stanowi to jeden z największych wydatków energetycznych oczyszczalni ścieków. Często także konieczne jest dozowanie dodatkowego, zewnętrznego źródła węgla organicznego niezbędnego do procesu denityfikacji. Z tego względu, coraz częściej zwraca się uwagę na zastosowanie alternatywnego procesu biologicznego - beztlenowego utleniania azotu amonowego (anammox), eliminującego wyżej wymienione problemy eksploatacyjne.

1.1. Proces anammox

Proces anammox prowadzony jest przez bakterie należące do typu *Planctomycetes*. Jest to proces anoksydacyjny i autotroficzny, który umożliwia utlenienie azotu amonowego do azotu cząsteczkowego, wykorzystując jako akceptor elektronów azotany (III). Oznacza to, że proces anammox nie wymaga napowietrzania, ani źródła węgla organicznego, niezbędnego w procesach heterotroficznych. W takiej sytuacji wymagane jest utlenienie do azotu azotanowego (III) tylko połowy azotu amonowego, co umożliwia znaczne zmniejszenie kosztów eksploatacyjnych względem tradycyjnych metod, o nawet 90% [Jetten i wsp., 2001].

Ponadto, pozwala on na znaczne ograniczenie emisji gazów cieplarnianych: dwutlenku węgla i tlenu azotu (IV) [Ma i wsp., 2016], a także większą szybkość usuwania azotu przy mniejszej o nawet 90% produkcji osadu nadmiernego [Jetten i wsp., 2001].

Mniejsza produkcja osadu związana jest z bardzo długim czasem podwojenia bakterii anammox. Chociaż według najnowszych badań może on być skrócony do nawet 2,1 dnia [Lotti i wsp., 2015a; Zhang i wsp., 2017], to większość badań wskazuje, że wynosi on od 10 do 20 dni [Kuenen, 2008; Jetten i wsp., 2009]. Tak wolny wzrost wymaga długiego czasu na wpracowanie procesu w nowym bioreaktorze, a także wydłuża czas regeneracji po ewentualnej awarii. Co więcej, są to wartości szybkości wzrostu w warunkach optymalnej temperatury, a więc w zakresie od 30 do 40°C [Jetten i wsp., 2009, Jin i wsp., 2012]. Poniżej 25°C aktywność bakterii anammox znacznie spada [Lotti i wsp., 2015b]. Kolejnym ograniczeniem procesu anammox jest obecność w ściekach związków organicznych, które powodują, że autotroficzne bakterie anammox mogą być wypierane przez heterotroficzne denitryfikatory. To wszystko, w połączeniu z szeregiem innych czynników (pH, stężenie tlenu, stężenie substratów) wpływających na efektywność procesu [Jin i wsp., 2012], czyni go wrażliwym na wszelkie zmiany parametrów technologicznych. W Tabeli 1 zestawiono zalety i wady wynikające z zastosowania procesu anammox.

Tabela 1. Zalety i wady systemu częściowej nityfikacji - anammox w porównaniu do systemu nityfikacji - denitryfikacji na podstawie Publikacji 1 [van Dongen i wsp., 2001; Siegrist i wsp., 2008; Jin i wsp., 2012; Nozhevnikova i wsp., 2012; Hu i wsp., 2013; Lackner i wsp., 2014; Ma i wsp., 2016].

WADY	ZALETY
<ul style="list-style-type: none"> • Niska szybkość wzrostu biomasy • Wymagane skuteczne zatrzymanie biomasy w reaktorze • Wysoka optymalna temperatura (30 - 40°C) • Wymagane niskie stężenie związków organicznych w ściekach • Długi czas rozruchu instalacji (100 - 390 dni) • Produkcja azotanów (V) • Duża wrażliwość na zmiany warunków prowadzenia procesu (np. temperaturę, pH, stężenie substratów) • Duża liczba potencjalnych inhibitorów: tlen, metale ciężkie, zasolenie, siarczki 	<ul style="list-style-type: none"> • Większa szybkość usuwania azotu • Możliwość oczyszczania ścieków o wysokim stężeniu azotu • Redukcja zapotrzebowania na tlen (o nawet 60%) • Brak zapotrzebowania na źródło węgla organicznego • Redukcja kosztów (o nawet 60%) • Mniejsze zapotrzebowanie na przestrzeń • Mniejsza produkcja osadu nadmiernego (o nawet 90%) • Zmniejszenie emisji gazów cieplarnianych (CO₂ i N₂O) o nawet 90%

Szczegółową charakterystykę procesu anammox przedstawiono w stanowiącym podstawę rozprawy doktorskiej artykule przeglądowym pt. „*Influence of temperature and pH on the anammox process: A review and meta-analysis*” (Publikacja 1).

1.2. Zastosowanie procesu anammox

Ponieważ substratami procesu anammox są azot amonowy i azotany (III), musi on być poprzedzony częściową nityfikacją, w wyniku której około połowa azotu amonowego jest utleniana do azotanów (III) przez nityfikatory I fazy. Takie połączenie to proces częściowej nityfikacji – anammox (ang. *Partial Nitrification/Anammox*, PN/A). W ostatnich latach obserwuje się na świecie znaczny wzrost liczby pełnoskalowych instalacji wykorzystujących proces anammox. Według danych literaturowych, pierwsze wdrożenie miało miejsce w 2002 roku [van der Star i wsp., 2007]. W roku 2008 istniało już co najmniej 5 instalacji [Jetten i wsp., 2009], a według ostatnich informacji z roku 2014, było to już ponad 100 obiektów [Lackner i wsp., 2014]. Około połowę tych instalacji stanowią sekwencyjne reaktory porcjowe (SBR), ale spotyka się też reaktory biologiczne ze złożem ruchomym (ang. *Moving Bed Biofilm Reactor*, MBBR) oraz reaktory z osadem granulowanym [Lackner i wsp., 2014]. Pomimo szybkiego wzrostu liczby takich oczyszczalni, są one ograniczone głównie do ścieków charakteryzujących się wysokim ładunkiem azotu, niskim ładunkiem związków organicznych oraz temperaturą powyżej 25°C [van Hulle i wsp., 2010]. Należą do nich odcieki składowiskowe, wody po odwadnianiu osadów ściekowych i ścieki przemysłowe.

Największe korzyści przyniosłoby jednak wdrożenie procesu anammox w głównym ciągu technologicznym miejskiej oczyszczalni ścieków, gdzie jego użycie wygenerowałoby ogromne oszczędności energii elektrycznej [Cao i wsp., 2017]. Główny wydatek energetyczny oczyszczalni ścieków związany jest z napowietrzaniem reaktorów biologicznych. Może on stanowić od 50 do nawet 80% całkowitego zapotrzebowania na energię [Siegrist i wsp., 2008; Gu i wsp., 2018]. Dlatego też, proces anammox wymieniany jest jako element niezbędny do osiągnięcia neutralnego, a nawet dodatniego bilansu energetycznego obiektu [Siegrist i wsp., 2008; Bozkurt i wsp., 2016; Cao i wsp., 2017]. Obliczenia wskazują na to, że wprowadzenie procesu PN/A do głównego ciągu technologicznego komunalnej oczyszczalni ścieków, przy

jednoczesnej fermentacji osadów ściekowych, pozwoli na zmniejszenie zużycia energii o 50% [Siegrist i wsp., 2008]. Natomiast wyniki przedstawione przez Khiewwijit i wsp. [2015] wskazują, że zastąpienie konwencjonalnego systemu nitryfikacji - denitryfikacji przez proces PN/A pozwoli na zmianę bilansu energetycznego obiektu z ujemnego (- 0,08 kWh/m³) na dodatni (0,24 kWh/m³).

Dlatego też na całym świecie prowadzone są intensywne badania, których celem jest wprowadzenie procesu anammox do głównego ciągu komunalnej oczyszczalni ścieków [Cao i wsp., 2017]. Aby zrealizować ten cel, należy zmierzyć się z trudną z punktu widzenia tego procesu charakterystyką ścieków komunalnych. Wymienia się tutaj trzy główne przeszkody: obecność związków organicznych, niskie stężenia azotu (< 100 mg N/L) oraz niską temperaturę (< 15 - 20°C) [van Hulle i wsp., 2010, Cao i wsp., 2017]. Jak już wspomniano, związki organiczne stymulują wzrost denitryfikatorów, mogących zdominować bakterie anammox, z którymi bakterie te współzawodniczą o substraty. Niskie stężenie azotu utrudnia supresję niepożądanych nitrifikatorów II fazy, szczególnie w niskiej temperaturze (10 - 15°C), będącej ostatnią z wymienionych przeszkód, która powoduje znaczny spadek aktywności i szybkości wzrostu bakterii anammox.

1.3. Proces anammox w niskich temperaturach

Przystosowanie procesu anammox do niskich temperatur (10 - 20°C) to obecnie jeden z wiodących trendów w dziedzinie biologicznych metod usuwania azotu ze ścieków. W takich temperaturach określany jest on często jako „zimny anammox”. Przegląd badań dotyczących wpływu temperatury na proces anammox przedstawiono w wydanej w 2017 roku pracy „Influence of temperature and pH on the anammox process: A review and meta-analysis” (Publikacja 1). Opisane we wspomnianej pracy badania dowiodły, że możliwa jest stopniowa adaptacja bakterii anammox do niskich temperatur w zakresie 10 - 15°C [Jin i wsp., 2012]. Jednak ze względu na niską szybkość wzrostu tych mikroorganizmów wymaga ona bardzo długiego czasu, od 140 [Laureni i wsp., 2015], przez 420 [Lotti i wsp., 2015b] i 722 [Hendrickx i wsp., 2014], do nawet 1000 dni [Sanchez Guillen i wsp., 2016]. Wskazano również, że biofilm i osad granulowany to najkorzystniejsze w tych warunkach formy występowania biomasy [Lotti i wsp., 2015c; Trojanowicz i wsp., 2016]. Warstwa polimerów zewnątrzkomórkowych

(ang. *Extracellular Polymeric Substances*, EPS) zapewnia ochronę nie tylko przed niską temperaturą, ale również innymi szkodliwymi czynnikami, takimi jak wahania pH, wysokie obciążenie ładunkiem azotu i obecność tlenu lub substancji toksycznych. Badania oparte na biologii molekularnej sugerują natomiast, że największe zdolności adaptacji wykazują bakterie z rodzaju *Candidatus Brocadia* i *Ca. Kuenenia* [Laureni i wsp., 2015; 2016; Taotao i wsp., 2015]. Pojawiły się też pierwsze eksperymenty w skali pilotażowej, demonstrujące możliwość stabilnego oczyszczania ścieków komunalnych w procesie częściowej nityfikacji - anammox w temperaturach 19 i 17°C [Lotti i wsp., 2015c; Trojanowicz i wsp., 2016].

Prowadzone od momentu wydania pracy przeglądowej (Publikacja 1) badania potwierdzają i poszerzają dotychczasową wiedzę na temat wpływu temperatury na proces anammox. Potwierdzają one, że preferencyjne formy wzrostu biomasy w warunkach głównego ciągu komunalnej oczyszczalni ścieków to biofilm i osad granulowany [Agraval i wsp., 2017; Li i wsp., 2017; Hoekstra i wsp., 2018; Reino i wsp., 2018; Yang i wsp., 2018]. Dominującym w tych warunkach rodzajem bakterii anammox jest *Ca. Brocadia* [Laureni i wsp., 2015; 2016; Agraval i wsp., 2017; Hoekstra i wsp., 2018; Reino i wsp., 2018], chociaż opisano też przypadki, w których był on wyparty przez bakterie należące do rodzaju *Ca. Jettenia* [Li i wsp., 2017] lub *Ca. Kuenenia* [Yang i wsp., 2018]. W badaniach laboratoryjnych zademonstrowano możliwość stabilnego prowadzenia procesu anammox w czasie oczyszczania rzeczywistych ścieków komunalnych w temperaturze 11°C, z efektywnością usuwania azotu na poziomie 82% [Reino i wsp., 2018]. Hoekstra i wsp. [2018] opisali doświadczenia z prowadzenia pilotażowego reaktora częściowej nityfikacji - anammox, pracującego w warunkach sezonowych zmian temperatury, w zakresie od 23 do 13°C. Adaptacja bakterii anammox do tak niskiej temperatury okazała się udana. Problemem jednak pozostało utrzymanie stabilnej pracy reaktora przy zmiennym charakterze dopływających ścieków, w szczególności pod względem obecności związków organicznych. Efektywne zastosowanie częściowej nityfikacji - anammox wymaga ciągłego monitoringu parametrów abiotycznych, szybkiego reagowania i utrzymywania korzystnych dla tego procesu warunków [Kamp i wsp., 2019].

Obok temperatury, jednym z podstawowym z punktu widzenia prowadzenia każdego procesu biologicznego parametrem jest odczyn. Jest on szczególnie istotny ze względu na fakt, że zarówno temperatura, jak i wartość pH determinują stężenie wolnego amoniaku, który jest

inhibitorem procesu anammox [Jin i wsp., 2012]. Optymalna dla bakterii anammox wartość pH mieści się w zakresie od 6,5 do 8,3 [Strous i wsp., 1999; van Hulle i wsp., 2007]. Zauważono jednak, że wpływ pH na aktywność bakterii anammox może być zależny od temperatury [Daverey i wsp., 2015]. Pomimo wielu badań nad wpływem wartości pH na proces anammox w temperaturach powyżej 30°C, brak było doniesień na temat jej znaczenia w temperaturach poniżej wartości optymalnej. Dlatego też, we wspomnianej już przeglądowej pracy „Influence of temperature and pH on the anammox process: A review and meta-analysis” (Publikacja 1), podjęto próbę zastosowania powszechnej w naukach medycznych, a rzadkiej w dziedzinie nauk środowiskowych, meta-analizy danych literaturowych. Okazała się ona przydatnym narzędziem i pozwoliła na wyciągnięcie wniosków wskazujących na to, że proces anammox w niskich temperaturach jest bardziej wrażliwy na zmiany pH, niż ma to miejsce w optymalnym zakresie temperatur. Potwierdzenie tej hipotezy wymagało jednak dalszych badań, które stały się jednym z celów cząstkowych prezentowanej rozprawy doktorskiej.

1.4. Wspomaganie procesu anammox za pomocą nanomateriałów

Pomimo dotychczasowych osiągnięć w dziedzinie zimnego procesu anammox, wyzwaniem w dalszym ciągu pozostaje czas adaptacji bakterii oraz utrzymanie stabilnego procesu, szczególnie w czasie sezonowych spadków temperatury. Z tego powodu coraz więcej badaczy sięga po różne metody przyspieszania adaptacji, wspomaganie wzrostu i aktywności bakterii anammox. Z powodzeniem wykorzystywano w tym celu ultradźwięki [Yu i wsp., 2013], wibracje [Zhang i wsp., 2018a] oraz pole elektryczne [Zhang i wsp., 2019]. Poza dostarczaniem zewnętrznej energii stosowano też dodatki różnego rodzaju mikroelementów. Wykazano, że dodatek jonu żelaza (II) w stężeniu 0,09 mM powoduje wzrost szybkości usuwania azotu w procesie anammox o 32% [Qiao i wsp., 2013] i zwiększa tempo wzrostu bakterii o nawet 46% [Liu i Ni, 2015]. Według innych badań, to samo stężenie jonów żelaza (II) spowodowało zwiększenie aktywności enzymatycznej dehydrogenazy hydrazyny (ang. *Hydrazine Dehydrogenase*, HDH) o 42% i skróciło czas wpracowania procesu anammox z 70 do 58 dni [Bi i wsp., 2014]. Kolejnym testowanym związkami był tlenek manganu (IV), którego korzystny wpływ na efektywność procesu anammox przedstawili Qiao i wsp. [2012]. Wyniki ich badań wykazały wzrost efektywności procesu o 45%. Rola tego typu mikroelementów związana jest

ze zwiększeniem aktywności enzymatycznej. Dodatek chinonowych mediatorów redoks spowodował trzykrotny wzrost aktywności enzymów odpowiedzialnych za reakcję anammox [Qiao i wsp., 2014]. Jednak badanie aktywności enzymatycznej prowadzono w ekstrakcie komórkowym, a wyniki nie przełożyły się na efektywność usuwania azotu przez bakterie anammox. Prawdopodobną przyczyną był brak przepuszczalności błony komórkowej dla tych związków, a także ich toksyczność względem mikroorganizmów.

Zupełnie nowy wymiar w dziejach nauki otworzył rozwój nanotechnologii, która umożliwiła naukowcom projektowanie struktur na poziomie atomu. Ze względu na unikalną strukturę i właściwości nanomateriały otworzyły też wiele możliwości rozwoju biotechnologii, tworząc zupełnie nową dziedzinę – nanobiotechnologię. Mnogość potencjalnych zastosowań, szczególnie medycznych i farmaceutycznych, wymusiła potrzebę prowadzenia badań nad wpływem nanomateriałów na organizmy żywe. Efekty wywoływane przez nanomateriały mogą być bardzo różnorodne. Zależą nie tylko od rodzaju nanostruktury, ale też od sposobu jej modyfikacji oraz badanych komórek, tkanek, czy organizmów. Dzięki temu dowiedziono, że niektóre z nich mogą hamować, a w odpowiednich stężeniach stymulować aktywność i wzrost bakterii anammox [Wang i wsp., 2013; Zhang i wsp., 2018b; Xu i wsp., 2019; Erdim i wsp., 2019]. Obecnie znajdują się wśród nich między innymi nanocząstki tlenku niklu (II), które w stężeniu 5 mg/L zwiększyły szybkość usuwania azotu o 9% [Xu i wsp., 2019]. Znaczną, bo aż 43% stymulację efektywności procesu odnotowano po dodaniu 200 mg/L nanocząstek maghemitu ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) [Zhang i wsp., 2018b]. W przypadku zero wartościowego żelaza (ang. *Zero Valent Iron*, ZVI) wzrost aktywności wyniósł 58%, mimo bardzo niskiego stężenia tych nanocząstek w zakresie od 0,0004 do 0,004 mg/L [Erdim i wsp., 2019]. Wszystkie wspomniane związki przyczyniły się też do wzrostu względnej liczby bakterii anammox, w stosunku do wszystkich bakterii badanej biomasy [Zhang i wsp., 2018b; Erdim i wsp., 2019; Xu i wsp., 2019].

Jednakże jednymi z pierwszych nanomateriałów zdolnymi do stymulacji procesu anammox były pochodne grafenu [Wang i wsp., 2013; Yin i wsp., 2015; 2016]. Grafen to przypominająca plaster miodu dwuwymiarowa struktura węglowa, o grubości jednego atomu. Ze względu na swoje wyjątkowe właściwości: dużą powierzchnię właściwą, wysoką wytrzymałość mechaniczną, dużą pojemność cieplną oraz znakomitą przewodność elektryczną, nazywany jest „materiałem przyszłości” [Wang i wsp., 2011]. Po raz pierwszy

wyzolowany został z grafitu w roku 2004 przez Geim'a i Novoselov'a, którzy za to dokonanie uhonorowani zostali Nagrodą Nobla (2010). Tlenek grafenu (ang. **Graphene Oxide**, GO), czyli utleniona forma grafenu, posiada na swojej podstawowej płaszczyźnie liczne tlenowe grupy funkcyjne: epoksydowe, hydroksylowe, karbonylowe i karboksylowe. W wyniku redukcji GO otrzymuje się zredukowany tlenek grafenu (ang. **Reduced Graphene Oxide**, RGO), pozbawiony większości grup tlenowych. Obie te formy występują w postaci kilku warstw, tworząc struktury o zróżnicowanej wielkości i kształcie.

Przedstawione w 2013 roku badania wykazały, że dodatek GO w stężeniu 75 mg/L, może zwiększyć efektywność procesu anammox o 10% [Wang i wsp., 2013]. Jeszcze lepsze wyniki zademonstrowano w stosunku do drugiej pochodnej grafenu, czyli zredukowanego tlenku grafenu (RGO). Dodatek 100 mg/L tego nanomateriału zwiększył szybkość usuwania azotu o 17% i pozwolił na skrócenie czasu wpracowania procesu anammox z 67 do 49 dni [Yin i wsp., 2015; 2016]. Podobne wyniki przedstawili Qiao i wsp. [2016], gdzie dodatek RGO w stężeniu 100 mg/L zwiększył aktywność bakterii anammox o 21%. Należy jednak zauważyć, że wszystkie wspomniane badania dotyczące wpływu nanomateriałów na aktywność bakterii anammox przeprowadzono w optymalnym dla nich zakresie temperatur (30 - 35°C) oraz w 25°C w przypadku nanocząstek ZVI. Brak było jednak badań w temperaturach poniżej 20°C, które to byłyby najbardziej wartościowe z punktu widzenia potencjalnego wykorzystania tych efektów w głównym ciągu komunalnej oczyszczalni ścieków. Istotną luką był też brak informacji o wpływie RGO na strukturę mikrobiologiczną zbiorowiska bakteryjnego oraz badań na temat tego, co dzieje się z samym nanomateriałem, jego strukturą i właściwościami.

2. TEZA BADAWCZA, CEL I ZAKRES PRACY

Przesłanki literaturowe pozwoliły na sformułowanie tezy badawczej, zgodnie z którą efektywność procesu anammox w temperaturach poniżej wartości optymalnej ($< 20^{\circ}\text{C}$) może być zwiększona poprzez dodatek zredukowanego tlenu grafenu (RGO).

Z tak postawionej tezy wynika główny cel pracy, którym była ocena wpływu zredukowanego tlenu grafenu (RGO) na aktywność bakterii anammox w niskich temperaturach ($10 - 20^{\circ}\text{C}$). Główny cel pracy realizowano w oparciu o 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.

3. METODYKA I PLAN BADAŃ

Do osiągnięcia postawionych celów badawczych zaplanowano szereg eksperymentów. Szczegółowy opis stosowanych materiałów i metodyki przedstawiono w poszczególnych publikacjach, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Cele cząstkowe realizowano w oparciu o badania wykonane według przedstawionego poniżej planu.

3.1. Cele cząstkowe I i II

- I. Określenie wpływu temperatury na aktywność bakterii anammox.
- II. Określenie wpływu pH na aktywność bakterii anammox w niskich temperaturach.

W pierwszej kolejności przeprowadzono przegląd literaturowy (**Publikacja 1**), który pozwolił na podsumowanie wiedzy na temat wpływu temperatury i odczynu na proces anammox oraz wskazanie potencjalnych obszarów badawczych w tym zakresie. Przegląd rozszerzono o meta-analizę danych literaturowych. Zauważono bowiem, że liczne badania nad wpływem temperatury wykonywane za pomocą krótkoterminowych testów porcjowych prowadzone były z zastosowaniem różnych wartości pH. Jest to szczególnie istotne ze względu na fakt, że oba te parametry (temperatura i pH) determinują stężenie inhibitorów procesu anammox - wolnego amoniaku i wolnego kwasu azotowego (III). Na podstawie wybranych danych obliczono w programie MATLAB (MathWorks®) współczynniki regresji równania wielomianowego drugiego stopnia, opisującego wpływ temperatury i pH na aktywność bakterii anammox, a uzyskane równanie przedstawiono za pomocą powierzchni odpowiedzi. Matematyczne zestawienie wyników badań nad wpływem temperatury na proces anammox, prowadzonych w różnych warunkach pH, pozwoliło na wyciągnięcie pierwszych wniosków dotyczących wpływu pH na aktywność bakterii anammox w temperaturach poniżej wartości optymalnej.

Kolejnym etapem było przeprowadzenie badań własnych (**Publikacja 2**). We wszystkich testach specyficzną aktywność bakterii anammox (ang. *Specific Anammox Activity*, SAA) wyznaczano na podstawie ubytku azotu ogólnego w krótkoterminowych testach porcjowych

(ang. *batch tests*). Pierwszy eksperyment dotyczący wpływu temperatury na aktywność bakterii anammox przeprowadzono dla 10, 15, 20, 25, 30, 35 i 40°C, przy stałym pH 7,5. Drugi, dotyczący wpływu pH wykonano dla wartości 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 i 9,0, przy stałej temperaturze 30°C. Trzeci eksperyment zaplanowano zgodnie z planem centralnym kompozycyjnym (ang. **Central Composite Design, CCD**). Statystyczne metody planowania eksperymentu stanowią skuteczne narzędzie do określania optymalnych parametrów procesowych, z uwzględnieniem interakcji pomiędzy badanymi parametrami. Celem eksperymentu była ocena wpływu interakcji pomiędzy temperaturą (w zakresie 10 - 30°C) a pH (6,5 - 8,5) na aktywność bakterii anammox. Na podstawie uzyskanych wyników i analizy regresji w programie STATISTICA (StatSoft®) wyznaczono współczynniki równania wielomianowego drugiego stopnia, opisującego zależność pomiędzy zmiennymi niezależnymi (temperaturą i pH), a zmienną zależną (SAA). Uzyskany model regresji przedstawiono na wykresie powierzchni odpowiedzi oraz przetestowano za pomocą analizy wariancji ANOVA. Uzyskane wyniki pozwoliły na określenie znaczenia pH dla efektywności tego procesu w niskich temperaturach.

3.2. Cel cząstkowy III

- III. Ocena krótkoterminowych efektów RGO na aktywność bakterii anammox w szerokim zakresie temperatur.

Do oceny wpływu RGO na aktywność bakterii anammox w szerokim zakresie temperatur (10 - 30°C) wykorzystano ponownie statystyczne metody planowania eksperymentu - plan centralny kompozycyjny (**Publikacja 3**). Było to tym bardziej istotne, że właściwości nanomateriałów grafenowych uzależnione są od temperatury [Zhu i wsp., 2010]. Na podstawie danych literaturowych oraz badań wstępnych, analizowane stężenia RGO wyznaczono w zakresie pomiędzy 15 a 85 mg/L. Aktywność bakterii anammox (SAA) mierzono na podstawie ubytku azotu ogólnego w krótkoterminowych testach porcjowych. Na podstawie uzyskanych wyników przeprowadzono analizę regresji w programie STATISTICA (StatSoft®) i wyznaczono współczynniki równania wielomianowego drugiego stopnia. Uzyskany model regresji przetestowano za pomocą analizy wariancji ANOVA i naniesiono

na wykres powierzchni odpowiedzi. Analiza wyników pozwoliła na wybór optymalnego stężenia RGO do dalszych badań długoterminowych.

3.3. Cele cząstkowe IV, V i VI

- IV. Ocena długoterminowych efektów 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.

Na tym etapie badania prowadzono w dwóch równoległych sekwencyjnych reaktorach porcjowych (SBR) o objętości 5 litrów, które zaszczepione zostały tym samym osadem czynnym anammox (**Publikacja 4**). Do jednego z nich dodany został RGO w stężeniu 15 mg/L, podczas gdy drugi prowadzony był jako kontrola. Reaktory pracowały w tych samych warunkach i konfiguracjach: hydrauliczny czas zatrzymania wynosił 1 dobę, pH na poziomie $7,6 \pm 0,3$, stężenie tlenu poniżej 0,1 mg/L. Temperatura procesu obniżana była stopniowo z 30 do 10°C. Reaktory zasilano pożywką syntetyczną, odpowiednią do wzrostu bakterii anammox [van de Graaf i wsp., 1996]. Stężenie azotu ogólnego regulowano za pomocą NH_4Cl oraz NaNO_2 w zakresie od 124 do 269 mg N/L. Dobrane wartości były znacznie niższe od wartości charakterystycznych dla większości dotychczasowych zastosowań procesu anammox (500 - 3000 mg N/L) [Ali i Okabe, 2015], a zbliżone bardziej do wartości obserwowanych w głównym ciągu komunalnej oczyszczalni ścieków (około 100 mg/L) [Lotti i wsp., 2015b]. W ciągu 316 dni eksperymentu wykonywano regularne pomiary stężenia form azotu: amonowego, azotanowego (III) i azotanowego (V)). Na tej podstawie możliwa była ocena efektywności procesu anammox.

Do określenia dokładnego składu biocenozy bakteryjnej w różnych okresach badawczych wykorzystano sekwencjonowanie metagenomowe nowej generacji, oparte o gen kodujący 16S rRNA. Analizie poddano próbki biomasy wykorzystanej do zaszczepienia reaktorów (inoculum) oraz próbki pobrane z obu reaktorów po 141 dniach od dodania RGO. Zmiany właściwości, składu i struktury RGO przed dodaniem i po 109 dniach inkubacji w bioreaktorze oceniono za pomocą zaawansowanych technik mikroskopowych

i spektroskopowych. Transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. *Transmission Electron Microscopy*, TEM) pozwoliła na obserwację kształtu i powierzchni nanocząstek RGO. Spektroskopia strat energii elektronów (ang. *Electron Energy Loss Spectroscopy*, EELS) dostarczyła danych dotyczących składu i stopnia utlenienia, a spektroskopia Ramana uzupełniła informacje na temat struktury - liczby warstw, stopnia nieuporządkowania podstawowej płaszczyzny grafenu.

4. PODSUMOWANIE

W prezentowanej pracy po raz pierwszy oceniono możliwość wspomagania procesu anammox w niskich temperaturach (10 - 20°C) za pomocą nanomateriału, jakim jest zredukowany tlenek grafenu (RGO). Dotychczasowe informacje wzbogacono też o wiedzę na temat wpływu RGO na strukturę zbiorowiska bakteryjnego oraz oddziaływania mikroorganizmów na właściwości tego nanomateriału.

Przed przystąpieniem do badań właściwych podjęto się określenia wpływu temperatury na specyficzną aktywność bakterii anammox (SAA) oraz ocenę znaczenia pH dla kontroli procesu anammox w niskich temperaturach (**Publikacja 1**). Potwierdzono, że wraz ze spadkiem temperatury dochodzi do znacznego zmniejszenia aktywności bakterii anammox. W ramach badań opisanych w **Publikacji 2** wykazano, że w stosunku do wartości osiąganey w 30°C, aktywność ta wyniosła kolejno 49% w 20°C, 29% w 15°C i zaledwie 6% w 10°C (**Publikacja 2, Figure 1A**). Analiza wyników uzyskanych na podstawie planu centralnego kompozycyjnego pozwoliła na wyznaczenie współczynników równania wielomianowego drugiego stopnia, które opisuje zależność pomiędzy zmiennymi niezależnymi (pH i temperaturą), a zmienną zależną (SAA). Analiza wariancji ANOVA (**Publikacja 2, Supplementary Table 1**) wykazała, że otrzymany model jest odpowiedni do opisywania zależności pomiędzy badanymi parametrami ($R^2 = 0,96$). Na podstawie uzyskanego wykresu powierzchni odpowiedzi zauważono, że wraz ze spadkiem temperatury zawęży się optymalny zakres pH. Najwyższą aktywność (> 90% wartości maksymalnej) w 30°C obserwowano w pH pomiędzy 7,0 a 8,5. W 10°C był to natomiast zakres od 7,7 do 8,0, co oznacza, że efektywność oczyszczania ścieków przez zimny proces anammox może być istotnie zwiększona dzięki korekcie i odpowiedniej kontroli odczynu (**Publikacja 2, Figure 3**). Takie zjawisko wynika prawdopodobnie z większej wrażliwości bakterii anammox na ten parametr w warunkach, które odbiegają od optymalnych. Może to być też związane ze zmianą w kinetyce reakcji anammox. Zauważono bowiem, że temperatura około 15 - 20°C stanowi swego rodzaju „punkt przełomowy” dla metabolizmu tych bakterii [Lotti i wsp., 2015b]. Analiza energii aktywacji obliczonej na podstawie równania Arrhenius'a potwierdza tę tezę (**Publikacja 2, Table 1**). Wartości energii aktywacji w zakresach 10 - 20°C i 20 - 40°C wyniosły odpowiednio 140 kJ/mol i 46 kJ/mol. Podobne rozbieżności obserwowano w badaniach

opisanych przez Isaka i wsp. [2008] oraz Lotti i wsp. [2015b]. Sugeruje się, że jest to związane z etapami reakcji anammox i odpowiedzialnymi za nie enzymami, o różnym optimum temperaturowym [Isaka i wsp., 2008].

Etap właściwych badań nad zredukowanym tlenkiem grafenu rozpoczęto od oceny krótkoterminowych efektów tego nanomateriału na aktywność bakterii anammox, w zakresie stężeń od 15 do 85 mg/L i zakresie temperatur od 10 do 30°C (**Publikacja 3**). Wyniki uzyskane na podstawie planu centralnego kompozycyjnego pozwoliły na wyznaczenie współczynników równania wielomianowego drugiego stopnia. Uzyskany model opisuje zależność pomiędzy temperaturą i stężeniem RGO a aktywnością bakterii anammox, wyrażoną jako procent w odniesieniu do kontroli bez dodatku RGO. Analiza wyników testów porcjowych wskazała na możliwość stymulacji aktywności bakterii anammox o 10% przy stężeniu RGO 15 mg/L i temperaturze 20°C oraz o 12% przy stężeniu 25 mg/L i temperaturze 13°C (Publikacja 3, *Figure 1*). Maksymalną 28% stymulację aktywności uzyskano w 13°C, przy stężeniu 15 mg/L. Obserwacje te są zbliżone do tych odnotowanych w testach krótkoterminowych z zastosowaniem GO i RGO w temperaturze 35°C [Wang i wsp., 2013; Yin i wsp., 2015]. Dodatek GO w stężeniu 75 mg/L zwiększył efektywność procesu anammox o 10% [Wang i wsp., 2013], podczas gdy dodatek 100 mg/L RGO zwiększył tę efektywność o 17% [Yin i wsp., 2015]. Podobne wyniki przedstawili Qiao i wsp. [2016] oraz Yin i wsp. [2016], gdzie dodatek RGO w stężeniu 100 mg/L zwiększył aktywność bakterii anammox w temperaturze 35°C o odpowiednio 21% i 27% w czasie eksperymentów długoterminowych. Najwyższą stymulację we wspomnianych badaniach obserwowano przy znacznie wyższych (100 mg/L) niż w prezentowanej pracy (15, 25 mg/L) stężeniach nanomateriału. Wyższe stężenia powodowały inhibicję procesu anammox, o nawet 30% w przypadku 50 mg/L w 20°C (Publikacja 3, *Figure 1*). Wang i wsp. [2013] oraz Yin i wsp. [2015] inhibicję na poziomie 6% i 21% odnotowali dopiero przy stężeniu 150 mg/L. Zauważono jednak, że efekt może zależeć nie od stężenia nanomateriału, ale od jego dawki w przeliczeniu na jednostkę suchej masy organicznej ($g_{s.m.o.}$). Optymalną dla stymulacji bakterii anammox dawkę RGO oceniono na zakres pomiędzy 20 a 45 mg/ $g_{s.m.o.}$ (Publikacja 3, *Table 3*). Analiza statystyczna potwierdziła możliwość stymulacji aktywności bakterii anammox w niskich temperaturach zredukowanym tlenkiem grafenu (Publikacja 3, *Table 2*). Co więcej okazało się, że obserwowany efekt stymulacji rośnie wraz ze spadkiem temperatury (Publikacja 3, *Figure 2*). Najlepsze rezultaty

obserwowano poniżej 15°C, co jest bardzo istotną i obiecującą informacją w świetle potencjalnego zastosowania RGO do wspomaganie zimnego procesu anammox.

Ostatnim, kluczowym etapem badań była ocena długoterminowych efektów w czasie 316 dni pracy dwóch laboratoryjnych reaktorów SBR, oczyszczających ścieki syntetyczne (**Publikacja 4**). Do jednego z reaktorów dodano RGO, a drugi prowadzony był jako kontrola. Przebieg eksperymentu podzielono na siedem etapów (Publikacja 4, *Figure 1*): (I) dni 1 - 41: stabilna praca przed dodaniem RGO; (II) dni 42 - 120: pierwszy dodatek RGO (15 mg/L) i stopniowe obniżenie temperatury z 30 do 15°C; (III) dni 121 - 182: praca w 13°C; (IV) dni 183 - 220: praca w 10°C; (V) dni 220 - 230: załamanie efektywności procesu; (VI) dni 231 - 245: podniesienie temperatury do 15°C, drugi dodatek RGO (15 mg/L) i odzyskanie efektywności procesu; (VII) dni 246 - 316: stabilna praca w 13°C. W tym przypadku, stężenie 15 mg/L przekładało się na początkową dawkę w momencie dodania RGO do reaktora (II etap) na poziomie 19 mg/g_{s.m.o.}. Wzrost średniego stężenia suchej masy osadu z $0,790 \pm 0,020$ g_{s.m.o.}/L w I etapie eksperymentu do $1,552 \pm 0,054$ g_{s.m.o.}/L w III etapie eksperymentu spowodował spadek dawki RGO do co najmniej 10 mg/g_{s.m.o.}. Niestety, ustalenie dokładnego stężenia RGO pozostającego w układzie w czasie trwania eksperymentu nie było możliwe. Ze względu na złożony charakter matrycy, brak jest metod zdolnych do precyzyjnego oznaczania stężeń materiałów grafenowych w systemach biologicznych [Goodwin i wsp., 2018]. Można natomiast określić, że po drugim dodatku RGO, jego dawka w VII etapie eksperymentu mieściła się w zakresie 12 - 25 mg/g_{s.m.o.}.

Najważniejszym osiągnięciem tego eksperymentu było udowodnienie, że dodatek RGO w stężeniu 15 mg/L, może zwiększyć efektywność procesu anammox w temperaturze 13°C (Publikacja 4, *Table 1; Figure 4*). W III etapie badań szybkość usuwania azotu w reaktorze kontrolnym i eksperymentalnym wynosiła odpowiednio $0,100 \pm 0,021$ i $0,115 \pm 0,017$ kg N/m³d, dając statystycznie istotną różnicę ($p < 0,05$) na poziomie 15%. Z kolei w VII etapie szybkości te wyniosły kolejno $0,058 \pm 0,013$ i $0,068 \pm 0,011$ kg N/m³d, co odpowiadało statystycznie istotnej ($p < 0,05$) stymulacji szybkości usuwania azotu o 17%. Sugeruje się, że odpowiedzialne za obserwowaną stymulację były dwa zjawiska. Po pierwsze, stymulacja wzrostu biomasy bakteryjnej, istotna szczególnie w wyższych temperaturach (> 15°C), gdzie tempo wzrostu bakterii było mniej spowolnione. Po drugie, bezpośredni wzrost szybkości reakcji anammox, który zaobserwowano wyłącznie poniżej 15°C. Takie obserwacje są zgodne

z wynikami testów krótkoterminowych, gdzie ze spadkiem temperatury obserwowano wzrost efektu stymulacji (Publikacja 3). Po raz kolejny potwierdza to też istnienie w tym zakresie temperatur „punktu przełomowego” dla metabolizmu bakterii anammox.

Kolejnych ciekawych informacji dostarczyła analiza składu biocenozy bakteryjnej. W czasie trwania eksperymentu liczba bakterii należących do typu *Planctomyces* wzrosła w obu badanych reaktorach. Z 17,80% do 21,25% w reaktorze kontrolnym i z 16,03% do 20,10% w reaktorze zawierającym RGO (Publikacja 4, *Figure 6*). Obserwowane różnice są nieistotne statystycznie, co pozwala sądzić, że RGO nie wpłynął na względną liczebność typu *Planctomyces*, do którego zaliczane są bakterie anammox, ani strukturę całej społeczności bakteryjnej. Wyniki te podkreślają, że bakterie żyjące w złożonych zbiorowiskach najprawdopodobniej mają wyższą odporność na czynniki zewnętrzne. Oznaczają też, że prawdopodobnie RGO nie wpływa selektywnie na obecność żadnego typu bakterii obecnych w badanej biomacie. Niemal równoległe do przedstawianej pracy, Li i wsp. [2019] prowadzili badania nad procesem anammox, poddanym długoterminowemu (61 dni) oddziaływaniu 1 i 10 mg/L tlenku grafenu (GO) w temperaturze 37°C. Zaprezentowane w obu pracach wyniki okazały się w dużej mierze spójne. Odnotowano kilkuprocentowy wzrost usunięcia azotu w reaktorze zawierającym 10 mg GO/L, a analiza składu biocenozy bakteryjnej podobnie nie wykazała wpływu na względną liczebność bakterii należących do typu *Planctomyces*.

Ponad to, po 109 dniach inkubacji w bioreaktorze anammox stwierdzono zmiany w strukturze i właściwościach RGO. Dzięki mikroskopii TEM zaobserwowano oznaki degradacji nanocząstek (Publikacja 4, *Figure 2a, b*). Krawędzie arkuszy RGO po inkubacji w reaktorze były nieregularne i poszarpane, w przeciwieństwie do materiału przed eksperymentem. Wyniki spektroskopii EELS sugerują zmniejszenie liczby warstw grafenowych, zwiększenie stopnia utlenienia oraz obecność wapnia (Publikacja 4, *Figure 2c, d*). Zwiększenie stopnia nieuporządkowania struktury oraz utlenienie RGO potwierdzają też wyniki spektroskopii Ramana (Publikacja 4, *Figure 3*). Obserwacje te pomogły w zaproponowaniu wyjaśnienia mechanizmów oddziaływania RGO z bakteriami. Stwierdzono bowiem, że dwuwartościowe kationy wapnia sprzyjają adsorpcji między komórkami bakteryjnymi [Peeters i wsp., 2011], których powierzchnie zazwyczaj naładowane są ujemnie. Obecność licznych grup tlenowych powoduje, że również powierzchnia RGO naładowana jest ujemnie [Dreyer i wsp., 2010]. Podczas gdy siły elektrostatyczne promują adsorpcję bakterii na cząstkach stałych [Hassard

i wsp., 2016], można przypuszczać, że dwuwartościowe kationy wapnia działają jako pewnego rodzaju łącznik pomiędzy RGO i komórkami, co pozytywnie oddziałuje na ich wzrost. Na podstawie pozostałych zmian w charakterystyce RGO, wskazano, że jest on utleniany przez organiczny mediator, zaangażowany w reakcje biochemiczne. Dzięki temu może on przyspieszać reakcje enzymatyczne odpowiedzialne za proces anammox. Dalsze wyjaśnienie i charakter tego mechanizmu pozostają jednak niejasne i wymagają kolejnych badań. Ponadto, pomimo dominacji bakterii anammox nie można z pewnością stwierdzić, które gatunki występujące w złożonej społeczności biomasy osadu czynnego biorą udział w utlenianiu RGO. Informacje na temat degradacji i modyfikacji nanomateriałów węglowych stanowią też dodatkową wartość. Wnoszą bowiem wkład w badania dotyczące biodegradacji tych związków, w szczególnie ważnej grupie mikroorganizmów oczyszczających ścieki. Rosnąca produkcja nanomateriałów to nie tylko nowe możliwości, ale też nowe zagrożenia, między innymi dla środowiska wodnego, a przez to oczyszczalni ścieków, która stanowi dla nich ostatnią zaporę.

Podsumowując, zaplanowane badania potwierdziły postawioną w pracy tezę badawczą. Zredukowany tlenek grafenu może wspomagać efektywność procesu anammox w niskich temperaturach. Otwartą kwestią pozostaje aspekt praktycznego zastosowania tego rozwiązania. Zdecydowaną wadą materiałów grafenowych są wysokie koszty. Jednak z uwagi na stosunkowo młody wiek tego materiału, rosnącą liczbę zastosowań i już obserwowane spadki cen [Perreault i wsp., 2015] można ze sporą pewnością przypuszczać, że jego produkcja będzie coraz tańsza. Drugą, konieczną do rozważenia kwestią jest możliwość toksycznego działania podwyższonych stężeń RGO. Pomimo intensywnych badań, wpływ nanomateriałów na środowisko wodne i żyjące w nim organizmy wciąż nie jest jasny. Wymagane byłoby więc zatrzymanie nanocząstek i nie dopuszczenie aby przedostawały się do środowiska. Utrudnia to fakt, że ze względu na złożony charakter matrycy nie istnieją metody zdolne do precyzyjnego oznaczania stężeń materiałów grafenowych w środowisku i systemach biologicznych [Goodwin i wsp., 2018].

5. WNIOSKI

Realizacja wszystkich założonych celów umożliwiła potwierdzenie postawionej tezy. Uzyskano wieloaspektowy obraz oddziaływań pomiędzy bakteriami a zredukowanym tlenkiem grafenu, uwzględniający efektywność zimnego procesu anammox, strukturę mikrobiologiczną prowadzącego go zbiorowiska mikroorganizmów oraz właściwości nanomateriału. Na tej podstawie sformułowano następujące wnioski.

- 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.
- W temperaturze poniżej 15°C dochodzi do zmiany w kinetyce reakcji anammox.
- Zredukowany tlenek grafenu może wspomagać efektywność procesu anammox w niskich temperaturach.
- Krótkoterminowe działanie 15 mg RGO/L (dawka 22 mg/g_{s.m.o.}) w temperaturze 13°C może powodować 28% stymulację aktywności bakterii anammox.
- Dodatek 15 mg RGO/L (początkowa dawka 19 mg/g_{s.m.o.}) w czasie długoterminowej pracy reaktora biologicznego może powodować 17% stymulację efektywności procesu anammox w temperaturze 13°C.
- Optymalna dla stymulacji bakterii anammox dawka zredukowanego tlenu grafenu wyznaczona podstawie testów krótko- i długoterminowych, mieści się w zakresie pomiędzy 19 a 45 mg/g_{s.m.o.}.
- Najsilniejsza stymulacji procesu anammox wywołana działaniem zredukowanego tlenu grafenu obserwowana jest w temperaturach poniżej 15°C.
- Mechanizm stymulacji procesu anammox wywołanej zredukowanym tlenkiem grafenu opiera się prawdopodobnie na dwóch zjawiskach. Są to: stymulacja wzrostu, istotna szczególnie w wyższych temperaturach (> 15°C) oraz przyspieszenie tempa reakcji biochemicznych, które zaobserwowano wyłącznie poniżej 15°C.
- Zredukowany tlenek grafenu nie wpływa na względną liczebność bakterii anammox, ani strukturę taksonomiczną społeczności bakteryjnej bioreaktora.
- Mikroorganizmy wchodzące w skład badanej biomasy są zdolne do degradacji i modyfikacji struktury zredukowanego tlenu grafenu.

LITERATURA

Ali M., Okabe S.: Anammox-based technologies for nitrogen removal: advances in process start-up and remaining issues. *Chemosphere* 141, 144-153, 2015.

Bi Z., Qiao S., Zhou J.T., Tang X., Zhang J.: Fast start-up of anammox process with a appropriate ferrous iron concentration, *Bioresour. Technol.*, 170, 506–512, 2014.

Bozkurt H., van Loosdrecht M.C.M., Gernaey K.V., Sin G.: Optimal WWTP process selection for treatment of domestic wastewater – A realistic full-scale retrofitting study. *Chemical Engineering Journal*, 286, 447-458, 2016.

Cao Y., van Loosdrecht M.C.M., Daigger G.T.: Mainstream partial nitrification-anammox in municipal wastewater treatment: status, bottlenecks, and further studies. *Appl Microbiol Biotechnol*, 101 : 1365, 2017.

Daverey A., Chei P.C., Dutta K., Lin J.G.: Statistical analysis to evaluate the effects of temperature and pH on anammox activity. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 102, 89-93, 2015.

Dreyer D.R., Park S., Bielawski C.W., Ruoff R.S.: The chemistry of Graphene oxide. *Chem. Soc. Rev.*, 39, 228-240, 2010.

Erdim E., Özkan Z.Y., Kurt H., Kocamemi, B.A. Overcoming challenges in mainstream Anammox applications: Utilization of nanoscale zero valent iron (nZVI). *Science of The Total Environment*, 651 (2), 3023-3033, 2019.

Goodwin D.G., Adeleye A.S., Sung L., Ho K.T., Burgess R.M., Petersen E.J.: Detection and Quantification of Graphene-Family Nanomaterials in the Environment. *Environmental Science & Technology*, 52 (8), 4491-4513, 2018.

Gu J., Yang Q., Liu Y.: Mainstream anammox in a novel A-2B process for energy-efficient municipal wastewater treatment with minimized sludge production. *Water Research*, 138, 1-6, 2018.

Hassard F., Gwyther C.L., Farkas K., Andrews A., Jones V., Cox B., Brett H., Jones D.L., McDonald J.E., Malham S.K.: Abundance and distribution of enteric bacteria and viruses in coastal and estuarine sediments e a review. *Front. Microbiol.*, 7 (1692), 1-31, 2016.

Hendrickx T. L. G., Kampman C., Zeeman G., Temmink H., Hu Z., Kartal B., Buisman C. J. N.: High specific activity for anammox bacteria enriched from activated sludge at 10°C. *Bioresource Technology*, 163, 214–221, 2014.

Hoekstra M., Geilvoet S.P., Hendrickx T.L.G., van Erp Taalman Kip C.S., Kleerebezem R., van Loosdrecht M.C.M: Towards mainstream anammox: lessons learned from pilot-scale research at WWTP Dokhaven. *Environmental Technology*, 40:13, 1721-1733, 2019.

Hu Z., Lotti T., de Kreuk M., Kleerebezem R., van Loosdrecht M., Kruit J., Jetten M. S. M., Kartal B.: Nitrogen removal by a nitrification-anammox bioreactor at low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79 (8), 2807-2812, 2013.

Isaka K., Date Y., Kimura Y., Sumino T., Tsuneda S.: Nitrogen removal performance using anaerobic ammonium oxidation at low temperatures. *FEMS Microbiol. Lett.*, 282, 32-38, 2008.

Jetten M.S.M., Wagner M., Fuerst, J., Loosdrecht M.V., Kuenen J.G., Strous M.: Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) process. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12, 283–288, 2001.

Jetten M.S.M., Niftrik L. van Strous M., Kartal B., Keltjens J. T., Op den Camp H. J. M.: Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44 (2-3), 65–84, 2009.

Jin R.-C., Yang G.-F., Yu J.-J., Zheng P.: The inhibition of the anammox process: A review. *Chem. Eng. J.*, 197, 67–79, 2012.

Kamp A., Ottosen L.D.M., Thøgersen N.B., Revsbech N.P., Thamdrup B., Andersen M.H.: Anammox and partial nitritation in the mainstream of a wastewater treatment plant in a temperate region (Denmark). *Water Sci Technol*, in press (doi: 10.2166/wst.2019.141), 2019.

Khiewwijit R., Temmink H., Rijnaarts H., Keesman K.J.: Energy and nutrient recovery for municipal wastewater treatment: How to design a feasible plant layout? *Environmental Modelling & Software*, 68, 156-165, 2015.

Kuenen J. G.: Anammox bacteria: from discovery to application. *Nature Reviews Microbiology*, 6 (4), 320–326, 2008.

Lackner S., Gilbert E.M., Vlaeminck S.E., Joss A., Horn H., van Loosdrecht M.C.M.: Full-scale partial nitritation/anammox experiences - An application survey. *Water Res.*, 55, 292-303, 2014.

Laureni M., Weissbrodt D. G., Szivak I., Robin O., Nielsen J. L., Morgenroth E., Joss A.: Activity and growth of anammox biomass on aerobically pre-treated municipal wastewater. *Water Res.*, 80, 325-366, 2015.

Laureni M., Falas P., Robin O., Wick A., Weissbrodt D. G., Nielsen J. L., Ternes T.A., Morgenroth E., Joss A.: Mainstream partial nitritation and anammox: long-term process stability and effluent quality at low temperature. *Water Res.*, 101, 628–639, 2016.

Li X., Sun S., Yuan H., Badgley B. D., He Z.: Mainstream upflow nitritation-anammox system with hybrid anaerobic pretreatment: Long-term performance and microbial community dynamics. *Water Research*, 125, 298–308, 2017.

Li H., Chi Z. Yan B.: Long-term impacts of graphene oxide and Ag nanoparticles on anammox process: Performance, microbial community and toxic mechanism. *Journal of Environmental Sciences*, 79, 239-247, 2019.

Liu Y., Ni B.J.: Appropriate Fe (II) addition significantly enhances anaerobic ammonium oxidation (anammox) activity through improving the bacterial growth rate. *Scientific Reports*, 5 : 8204, 1-7, 2015.

Lotti T., Kleerebezem R., Abelleira-Pereira J.M., Abbas B., van Loosdrecht M.C.M.: Faster through training: The anammox case. *Water Research*, 81, 261-268, 2015a.

Lotti T., Kleerebezem R., van Loosdrecht M.C.M.: Effect of temperature change on Anammox activity. *Biotechnol. Bioeng.*, 122 (1), 98-103, 2015b.

Lotti T., Kleerebezem R., Hu Z., Kartal B., de Kreuk M.K., van Erp Taalman Kip C., Kruit J., Hendrickx T.L.G, van Loosdrecht M.C.M.: Pilot-scale evaluation of anammox-based mainstream nitrogen removal from municipal wastewater. *Environ. Tech.*, 36 (9), 1167-1177, 2015c.

Ma B., Wang S., Cao S., Miao Y., Jia F., Du R., Peng Y.: Biological nitrogen removal from sewage via anammox: Recent advantages. *Bioresour. Technol.*, 200, 981-990, 2016.

Nozhevnikova A. N., Simankova M. V., Litti Y. V.: Application of the microbial process of anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) in biotechnological wastewater treatment. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 48 (8), 667-684, 2012.

Peeters B., Dewil R., Lechat D., Smets I.Y.: Quantification of the exchangeable calcium in activated sludge flocs and its implication to sludge settleability. *Separ. Purif. Technol.*, 20 (83), 1-8, 2011.

Perreault F., de Faria A.F., Elimelech M.: Environmental applications of graphene-based nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.*, 44, 5861-5896, 2015.

Qiao S., Bi Z., Zhou J., Cheng Y., Zhang J., Bhatti Z.: Long term effect of MnO₂ powder addition on nitrogen removal by anammox process. *Bioresour. Technol.*, 124, 520-525, 2012.

Qiao S., Zhen B., Zhou J., Cheng Y., Zhang J.: Long term effects of divalent ferrous ion on the activity of anammox biomass. *Bioresour. Technol.*, 142, 490-497, 2013.

Qiao S., Tian T., Zhou J.T.: Effects of quinoid redox mediators on the activity of anammox biomass. *Bioresour. Technol.*, 152, 116-123, 2014.

Qiao S., Yin X., Zhou J.: Application of cathode modified by reduced graphene oxide/polypyrrole to enhance anammox activity. *RSC Adv.*, 6, 97208-97215, 2016.

Reino C., Suárez-Ojeda M.E., Pérez J., Carrera J.: Stable long-term operation of an upflow anammox sludge bed reactor at mainstream conditions. *Water Research*, 128, 331-340, 2018.

Sanchez Guillen J.A., Lopez Vazquez C.C., de Oliveira Cruz L.M., Brdjanovic D., van Lier J.B.: Long-term performance of the Anammox process under low nitrogen sludge loading rate and moderate to low temperature. *Biochem. Eng. J.*, 110, 95-106, 2016.

Siegrist H., Salzgeber D., Eugster J., Joss A.: Anammox brings WWTP closer to energy autarky due to increased biogas production and reduced aeration energy for N-removal. *Water Science & Technology*, 57.3, 383-388, 2008.

Strous M., Kuenen J.G., Jetten M.S.M.: Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65 (7), 3248-3250, 1999.

Taotao Z., Dong L., Huiping Z., Shuibo X., Wenxin Q., Yingjiu L., Jie Z.: Nitrogen removal efficiency and microbial community analysis of ANAMMOX biofilter at ambient temperature. *Water Sci. Technol.*, 71.5, 725-733, 2015.

Trojanowicz K., Plaza E., Trela J.: Pilot scale studies on nitrification-anammox process for mainstream wastewater at low temperature. *Water Sci. Technol.*, 73.4, 761-768, 2016.

van de Graaf A.A., de Bruijn P., Robertson L.A., Jetten M.S.M., Kuenen J.G.: Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, 142, 2187-2196, 1996.

van Dongen U., M. S. Jetten, M. C. van Loosdrecht: The SHARON-Anammox process for treatment of ammonium rich wastewater. *Water Sci. Technol.*, 44 (1), 153-60, 2001.

van der Star W.R.L., Abma W.R., Blommers D., Mulder J.W., Tokutomi T., Strous M., Picioreanu C., van Loosdrecht M.C.M.: Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam. *Water Research*, 41 (18), 4149-4163, 2007.

van Hulle S.W.H., Volcke E.I.P., Teruel J.L., Donckels B., van Loosdrecht, M.C.M., Vanrolleghem P.A.: Influence of temperature and pH on the kinetics of the Sharon nitritation process. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 82 (5), 471-480, 2007.

van Hulle S.W.H., Vandeweyer H.J.P., Meesschaert B.D., Vanrolleghem P.A., Dejans P., Dumoulin A.: Engineering aspects and practical application of autotrophic nitrogen removal from nitrogen rich streams. *Chem. Eng. J.*, 162 (1), 1-20, 2010.

Wang Y., Li Z., Wang J., Li J., Lin Y.: Graphene and graphene oxide: biofunctionalization and applications in biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 29 (5), 205-212, 2011.

Wang D., Wang G., Zhang G., Xu X., Yang F.: Using graphene oxide to enhance the activity of anammox bacteria for nitrogen removal. *Bioresour. Technol.*, 131, 527-530, 2013.

Xu J.J., Cheng Y.F., Xu L.Z.J., Liu Y.Y., Zhu B.Q., Fan N.S., Huang B.C., Jin R.C.: The revolution of performance, sludge characteristics and microbial community of anammox biogranules under long-term NiO NPs exposure. *Science of The Total Environment*, 649, 440-447, 2019.

Yang Y., Zhang L., Cheng J., Zhang S., Li X., Peng Y.: Microbial community evolution in partial nitritation/anammox process: From sidestream to mainstream. *Bioresource Technology*, 251, 327-333, 2018.

Yin X., Qiao S., Yu C., Tian T., Zhou J.: Effects of reduced graphene oxide on the activity of anammox biomass and key enzymes. *Chem. Eng. J.*, 276, 106-112, 2015.

Yin X., Qiao S., Zhou J., Tang X.: Fast start-up of the anammox process with addition of reduced graphene oxides. *Chem. Eng. J.*, 283, 160-166, 2016.

Yu J.J., Chen H., Zhang J., Ji Y.X., Liu Q.Z., Jin R.C.: Enhancement of ANAMMOX activity by low-intensity ultrasound irradiation at ambient temperature. *Bioresour. Technol.*, 142, 693-696, 2013.

Zhang L., Narita Y., Gao L., Ali M., Oshiki M., Okabe S.: Maximum specific growth rate of anammox bacteria revisited. *Water Research*, 116, 296-303, 2017.

Zhang K., Yang B., Ma Y., Lyu L., Pan Y., Wang Y., Li H., Zhu T.: A novel anammox process combined with vibration technology. *Bioresource Technology*, 256, 277-284, 2018a.

Zhang Z.Z., Cheng Y.F., Bai Y.H., Xu L.Z.J., Xu J.J., Shi Z.J., Zhang Q.Q., Jin R.C.: Enhanced effects of maghemite nanoparticles on the flocculent sludge wasted from a high-rate anammox reactor: Performance, microbial community and sludge characteristics. *Bioresource Technology*, 250, 265-272, 2018b.

Zhang C., Li L., Hu X., Wang F., Qian G., Qi N., Zhang C.: Effects of a pulsed electric field on nitrogen removal through the ANAMMOX process at room temperature. *Bioresource Technology*, 275, 225-231, 2019.

Zhu B.Y., Murali S., Cai W., Li X., Suk J.W., Potts J.R., Ruoff R.S.: Graphene and graphene oxide: synthesis, properties and applications. *Adv. Mater.*, 22, 3906-3924, 2010.

6. PUBLIKACJE BĘDĄCE PODSTAWĄ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Publikacja 1

Tomaszewski M., Cema G., Ciesielski S., Łukowiec D., Ziemińska-Buczyńska A.: Cold anammox process and reduced graphene oxide - varieties of effects during long-term interaction. *Water Research*, 156, 71-81, 2019.

DOI: 10.1016/j.watres.2019.03.006

Publikacja 2

Tomaszewski M., Cema G., Ziemińska-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.

DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.07.283

Publikacja 3

Tomaszewski M., Cema G., Ziemińska-Buczyńska A.: Significance of pH control in anammox process performance at low temperature. *Chemosphere*, 185, 439-444, 2017.

DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.07.034

Publikacja 4

Tomaszewski M., Cema G., Ziemińska-Buczyńska A.: Influence of temperature and pH on the anammox process: A review and meta-analysis. *Chemosphere*, 182, 203-214, 2017.

DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.05.003