



Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki  
Katedra Biotechnologii Środowiskowej

## **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

## STRESZCZENIE

Proces beztlenowego utleniania azotu amonowego (ang. *anaerobic ammonium oxidation*, anammox) stanowi obiecującą alternatywę dla powszechnie wykorzystywanych metod usuwania azotu ze ścieków. Wykorzystanie tego procesu w oczyszczaniu ścieków komunalnych pozwoliłoby na znaczne ograniczenie kosztów eksploatacji, a także przyczyniło się do zmniejszenia emisji gazów cieplarnianych. Niestety, odpowiedzialne za prowadzenie tego procesu bakterie charakteryzują się niską szybkością wzrostu i stosunkowo wysokim optimum temperaturowym (30 - 40°C), co stanowi jedną z głównych przeszkód dla jego aplikacji w głównym ciągu komunalnej oczyszczalni ścieków. Z tego powodu poszukuje się sposobów na zwiększenie aktywności procesu anammox w temperaturach poniżej 20°C (tzw. „zimny anammox”). Innowacyjnym rozwiązaniem tego problemu mogą być nanomateriały. Najnowsze doniesienia literaturowe dowodzą, że pochodne grafenu mogą stymulować aktywność i szybkość wzrostu bakterii anammox w temperaturze 35°C. W związku z tym sformułowano tezę, że efektywność procesu anammox w niskich temperaturach może być zwiększona poprzez dodatek zredukowanego tlenku grafenu (ang. *Reduced Graphene Oxide*, RGO). Głównym celem pracy była więc ocena wpływu RGO na aktywność bakterii anammox w niskich temperaturach (10 - 20°C).

W ramach pracy określono: (I) wpływ temperatury na aktywność bakterii anammox za pomocą testów porcjowych; (II) wpływ pH na aktywność bakterii anammox w niskich temperaturach, przy użyciu testów porcjowych zaplanowanych zgodnie z planem centralnym kompozycyjnym; (III) krótkoterminowe efekty wpływu RGO na aktywność bakterii anammox w szerokim zakresie temperatur, za pomocą testów porcjowych zaplanowanych zgodnie z planem centralnym kompozycyjnym; (IV) długoterminowe efekty wpływu RGO na efektywność procesu anammox w niskich temperaturach na podstawie pracy sekwencyjnego reaktora biologicznego (ang. *Sequencing Batch Reactor*, SBR); (V) wpływ RGO na strukturę biocenozy bakteryjnej, za pomocą sekwencjonowania metagenomowego; (VI) wpływ aktywności mikrobiologicznej na strukturę i właściwości RGO z wykorzystaniem zaawansowanych technik mikroskopowych i spektroskopowych.

Etap badań wstępnych wykazał, że optymalny zakres pH może zawężyć się wraz ze spadkiem temperatury, co oznacza, że zachowanie optymalnej kondycji zimnego procesu

anammox wymaga precyzyjnej kontroli tego parametru. Właściwe badania nad wpływem RGO wskazują na możliwość stymulacji procesu anammox w niskich temperaturach. Maksymalną stymulację aktywności bakterii anammox obserwowano w temperaturze 13°C, przy stężeniu RGO 15 mg/L. W testach krótkoterminowych i długoterminowych była to odpowiednio 28% i 17% stymulacja. Co więcej, odnotowano, że efekt stymulacji rośnie wraz ze spadkiem temperatury, co potwierdziło wcześniejsze obserwacje, że w przedziale temperatur pomiędzy 15 a 20°C dochodzi do zmiany w kinetyce reakcji anammox. Zestawienie wszystkich otrzymanych wyników pozwoliło stwierdzić, że efekt RGO może zależeć nie tylko od stężenia nanomateriału, ale też od jego dawki w stosunku do jednostki biomasy. Optymalną dla stymulacji bakterii anammox dawkę RGO wyznaczono na zakres pomiędzy 20 a 45 mg/g<sub>s.m.o.</sub> (suchej masy organicznej). Analiza mikrobiologiczna z użyciem sekwencjonowania metagenomowego wykazała natomiast, że oddziaływanie RGO nie wpływa na strukturę biocenozy bakteryjnej. Sugeruje to, że bakterie żyjące w złożonych zbiorowiskach wykazują wyższą odporność na czynniki zewnętrzne. Ponadto, stwierdzono zmiany w strukturze i właściwościach RGO, które wskazują na możliwość biologicznej degradacji i modyfikacji nanocząstek. Analiza wszystkich wyników pozwoliła zaproponować wyjaśnienie dwóch zjawisk odpowiedzialnych za zwiększenie efektywności procesu anammox: stymulacji wzrostu biomasy bakteryjnej oraz zdolności przyspieszania reakcji enzymatycznych.

Podsumowując, przeprowadzone badania dowiodły, że dodatek RGO może wspomagać efektywność procesu anammox w niskich temperaturach. Uzyskano wszechstronny obraz oddziaływań pomiędzy bakteriami i RGO, uwzględniający efektywność procesu anammox, strukturę mikrobiologiczną zbiorowiska prowadzącego proces oraz właściwości nanomateriału. Dodatkowo, informacje na temat biodegradacji nanomateriału węglowego stanowią cenną informację z punktu widzenia zagrożeń płynących z rosnącej emisji tych nanocząstek do środowiska.

## ABSTRACT

Anaerobic ammonium oxidation (anammox) process is assumed to be the most efficient method of biological nitrogen removal from wastewater. Its application in the mainstream of the municipal wastewater treatment plant (WWTP) will offer a significant reduction of operating costs and greenhouse gases emission. Unfortunately, bacteria performing anammox process are characterized by low growth rate and relatively high optimal temperature (30 - 40°C), that is one of the main limitations for its implementation in the municipal WWTP. Therefore, the intensification of the anammox activity at temperatures below 20°C (so-called 'cold anammox') has been the focus of recent investigations. Nanomaterials can be an innovative solution to this problem. Several recent studies indicate that the activity and growth rate of the anammox bacteria at 35°C can be accelerated by graphene derivatives. Therefore, it was reasonable to assume that the addition of reduced graphene oxide (RGO) may increase anammox process efficiency at low temperature. Thus, the main objective of this work was to evaluate RGO influence on the anammox process at low temperature (10 - 20°C).

Presented work evaluated: (I) the influence of temperature on the anammox bacteria activity using batch experiments; (II) effect of pH on the anammox activity at low temperatures using batch experiments, planned in accordance with the central composite design (CCD); (III) short-term effects of RGO on the anammox bacteria activity in a wide range of temperature using batch experiments planned in accordance with the CCD; (IV) long-term effects of RGO on the low-temperature anammox process in a sequencing batch reactor (SBR); (V) RGO influence on the bacterial community structure composition by metagenomic approach; (VI) microbial impact on the structure and properties of the RGO, using advanced microscopic and spectroscopic techniques.

Preliminary studies showed that the optimal pH range narrows along with a temperature decrease, which indicates that anammox performance at a low temperature may be supported by more accurate pH control. Proper research indicated that the activity of anammox biomass could be enhanced at low temperatures by RGO. Maximum stimulation of the anammox bacteria activity was observed at 13°C, with the addition of 15 mg/L of RGO. During short- and long-term experiments 28% and 17% stimulation was observed, respectively. Moreover, it was noted that the activity increase tends to be stronger at lower

temperatures ( $< 20^{\circ}\text{C}$ ), which is probably connected with the change in the kinetics of the anammox reaction in these temperatures. Summary of all obtained results allowed to state that RGO effects probably do not depend on the nanomaterial concentration, but on the dose per biomass unit. The optimal dose for the anammox stimulation was evaluated between 20 and 45 mg/g VSS (volatile suspended solids). Microbial analysis showed, that the bacterial community structure was not influenced by the addition of RGO. These results underscore that bacteria living in complex communities seem to have a higher resistance towards external agents such as RGO. Moreover, after incubation in the anammox bioreactor RGO showed signs of degradation and chemical changes. Based on all results analysis, it was proposed that RGO can stimulate anammox activity in two ways: bacteria growth rate stimulation and the increase in the enzymatic reactions rate.

In conclusion, the presented work proved that the addition of RGO can support the efficiency of the anammox process at low temperatures. The interdisciplinary approach included RGO influence on the nitrogen removal, bacterial community structure composition and bacterial impact on the structure of the nanomaterial. Additionally, presented results revealed, that bacteria living in the anammox activated sludge community can degrade and/or modify the structure of the nanomaterial. Since a greater concentration of graphene-based nanomaterials is expected in the wastewater treatment plants, this observation is very promising.