

Streszczenie poszerzone rozprawy doktorskiej autorstwa Kamrana Ayaz pt.: *Application of Pure and Mixed Cultures of Bacteria Strains in Synthetic Dyes Removal Processes – Mechanisms and Optimisation of Process Conditions*

Tytuł w języku polskim: (Zastosowanie czystych i mieszanych kultur bakteryjnych w procesach usuwania barwników syntetycznych – mechanizmy i optymalizacja warunków procesu)

Barwniki syntetyczne są wytwarzane i stosowane na bardzo dużą skalę, szczególnie w przemyśle tekstylnym, ponieważ zapewniają wysoką intensywność barwy, szeroki zakres odcieni oraz odpowiednią trwałość wybarwienia. Barwienie włókien jak i innych materiałów prowadzi się przy ściśle kontrolowanych parametrach, takich jak pH, poziom zasolenia, temperatura oraz stosowanie środków pomocniczych. Warunki te utrzymują barwnik w stanie stabilnym i rozpuszczalnym, pomagają w jego wiązaniu się z powierzchnią włókien oraz z docelowymi miejscami na powierzchni materiałów innych niż włókna. W wielu konwencjonalnych procesach barwienia duża część zastosowanego barwnika nie wiąże się wystarczająco trwale z powierzchnią włókna. Skutkuje to tym, że znaczne ilości niezwiązanych barwników trafiają do ścieków przemysłowych, ponadto w przypadku barwników nieutralowanych wystarczająco silnie na włóknie zostaje wypłukana podczas etapu prania, a następnie również trafia do ścieków. Ścieki z przemysłu barwierskiego, są chemicznie złożone, a w wyniku procesowych strat barwnika silnie zabarwione. Odpływ często zawiera nie tylko barwniki nieutralowane, lecz także sole, zasady lub kwasy, dodatki takie jak surfaktanty, dyspergatory, środki zwilżające oraz inne środki pomocnicze. W efekcie ścieki tekstylne zwykle charakteryzują się silną barwą, wysokim ładunkiem organicznym, zmiennym pH oraz wysoką przewodnością. Te cechy utrudniają oczyszczanie ścieków tekstylnych w standardowych systemach oczyszczania ścieków. Złożony skład tych ścieków tłumaczy również trudności związane z aplikowaniem rozwiązań dotyczących ich oczyszczania opracowanych w warunkach laboratoryjnych.

Problem obecności barwników syntetycznych w ściekach i wodach powierzchniowych staje się poważniejszy w przypadku barwników dobrze rozpuszczalne w wodzie i anionowych. Barwniki te są celowo projektowane tak, aby pozostawały rozpuszczalne i stabilne w wodnych kąpielach barwierskich, utrzymywały siłę barwy oraz były odporne na blaknięcie podczas użytkowania. Te same właściwości, które czynią je skutecznymi i atrakcyjnymi w barwieniu, sprawiają także, że trudno je usunąć z wody. Wysoka rozpuszczalność i silny ładunek jonowy

obniżają skuteczność usuwania metodami prostego rozdziału faz stałej i ciekłej. W wielu przypadkach zmniejszają również adsorpcję na typowych nośnikach lub biomasie, chyba że stosuje się specjalne materiały powierzchniowe lub wysokie dawki chemikaliów. Jednocześnie ich stabilna struktura czyni je odpornymi na rozkład wywołany światłem oraz degradację mikrobiologiczną. Z powodu tych cech dobrze rozpuszczalne barwniki anionowe mogą utrzymywać się w wodach naturalnych i pozostawać widoczne nawet przy bardzo niskich stężeniach. Nawet niewielkie ilości barwnika mogą nadawać wodzie bardzo intensywną barwę, co pogarsza jakość wizualną, a co gorsza zmniejsza przenikanie światła. Ograniczone przenikanie światła może ograniczać fotosyntezę glonów i roślin wodnych. Może to następnie zaburzać produkcję pierwotną, pogłębiać deficyt tlenowy oraz wpływać na sieci troficzne i ogólne funkcjonowanie ekosystemu.

Wśród barwników syntetycznych barwniki azowe są najczęściej i w największych ilościach stosowaną grupą barwników w przemyśle barwierskim. Są szeroko używane, ponieważ można je wytwarzać w szerokiej gamie kolorystycznej i strukturalnej przy stosunkowo niskich kosztach, a także projektować pod kątem barwienia różnych włókien i klas zastosowań. Jednak barwniki azowe często trudno poddają się biologicznym procesom oczyszczania i stanowią istotny problem interpretacyjny w badaniach nad oczyszczaniem ścieków je zawierających. Wiele układów biologicznych wykazuje zdolność rozszczepienia (w procesie redukcji) wiązania azowego $N=N$. Redukcja ta niszcząc układ chromoforowy prowadzi do szybkiej utraty barwy. Jeśli usuwanie barwy pozostaje głównym punktem monitorowania, może to wyglądać jak skuteczne oczyszczanie. Jednak samo rozszczepienie wiązania azowego w barwnikach azowych prowadzi do powstania aromatycznych produktów ubocznych - amin aromatycznych, które są bezbarwne, toksyczne i mogą się utrzymywać w środowisku i wymagać dalszego utleniania w celu zmniejszenia ryzyka środowiskowego. Innymi słowy, proces może szybko usuwać barwę, a jednocześnie pozostawiać produkty transformacji istotne dla kontroli zanieczyszczeń i bezpieczeństwa środowiskowego. Obecność barwników syntetycznych w środowisku w zależności od ich struktury, stężenia i czasu oddziaływania, może zaburzać wzrost, rozwój i rozmnażanie organizmów wodnych, powodować uszkodzenia wielu narządów poprzez stres oksydacyjny. Barwniki azowe i ich produkty transformacji są powiązane z ich toksycznością, genotoksycznością oraz szerszymi zagrożeniami dla zdrowia środowiskowego, co uzasadnia ostrożne zarządzanie i solidne oczyszczanie przed zrzutem do cieków wodnych.

Z tego powodu skuteczności oczyszczania ścieków barwnikowych nie należy oceniać wyłącznie na podstawie utraty barwy. Wiarygodne oczyszczanie wymaga dowodów rzeczywistej transformacji chemicznej, kontroli możliwych produktów ubocznych oraz projektów procesowych. Stwarza to wyraźną potrzebę badań, które łączą możliwości biologiczne, mechanizmy reakcji oraz inżynierską kontrolę warunków pracy.

Niniejsza rozprawa wpisuje się w tą problematykę poprzez badania nad optymalizacją procesów usuwania barwników syntetycznych z użyciem czystych i mieszanych kultur bakterii. W pierwszym etapie prowadzono badania z użyciem barwników z grupy trifenylometanowych i azowych. Większość eksperymentów oparto jednak na procesach usuwania disazowego barwnika Evans Blue (EB, Direct Blue 53). Barwnik ten wybrano jako testowy z kilku powodów, opisanych poniżej. EB reprezentuje grupę najpowszechniej stosowanych barwników anionowych, silnie sulfonowanych, bardzo dobrze rozpuszczalnych w wodzie, o intensywnej barwie i szczególnie trudnych w usuwaniu ze ścieków. Jako barwnik azowy jest on zaprojektowany tak, aby pozostawał stabilny i rozpuszczalny w wodnych kąpieliach barwierskich. Wysoka rozpuszczalność i ujemny ładunek zmniejszają adsorpcję na wielu typowych nośnikach, więc samo usuwanie fizyczne jest często ograniczone, chyba że stosuje się specjalne warunki. Aromatyczna i sulfonowana struktura EB jest projektowana pod kątem stabilności, co często wiąże się z trwałością w środowisku i powolną degradacją, gdy warunki nie są kontrolowane. Właściwości te czynią EB wymagającym związkiem testowym zarówno w aspekcie oczyszczania biologicznego, jak i bioelektrochemicznego.

W badaniach oczyszczania ścieków usuwanie barwy jest często raportowane jako główny wskaźnik sukcesu. Jednak dla sulfonowanych barwników azowych, takich jak EB, zmiany barwy mogą zachodzić bez pełnej transformacji. Zachowanie chromoforu może się zmieniać bez całkowitego rozpadu, a składniki ścieków mogą wpływać na widma, dlatego sama dekoloryzacja mierzona za pomocą spektrofotometrii UV-Vis nie jest wystarczającym dowodem oczyszczania. W tej rozprawie UV-Vis służy do śledzenia kinetyki, ale wnioski są wzmacniane dodatkowymi metodami analitycznymi, które potwierdzają ubytek barwnika macierzystego i identyfikują produkty transformacji. W ten sposób dekoloryzacja jest traktowana jako ważny sygnał, ale jest wsparta silniejszymi dowodami potwierdzającymi rzeczywistą zmianę chemiczną, będącą wynikiem biotransformacji związku.

Badania prowadzono etapami, których charakter ewoluował w zależności od uzyskiwanych wyników. Każdy z etapów był inspiracją do ukierunkowania badań w kolejnym etapie. W

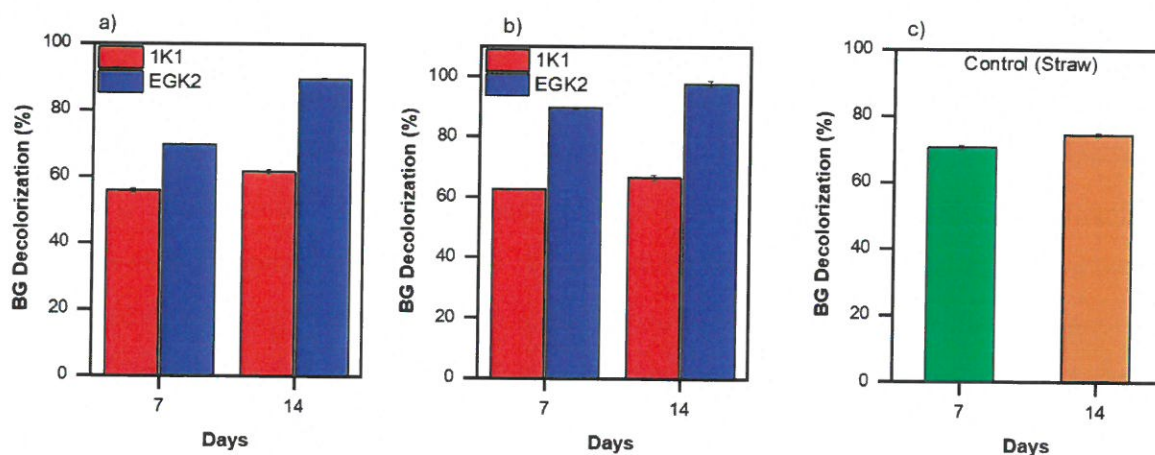
pierwszych etapach praca skupia się na kontrolowanych układach biologicznych, a następnie przechodzi do zaprojektowanych układów bioelektrochemicznych. Na każdym etapie celem jest nie tylko poprawa wydajności, ale także poprawa interpretacji i kontroli procesu. Pierwszy etapy badań identyfikuje potencjał mikroorganizmów i pokazuje ograniczenia interpretacyjne i procesowe immobilizacji biomasy na naturalnych nośnikach stałych. W kolejnym etapie badania zostały oparte na czystym, zidentyfikowanym i dobrze opisanym szczepie bakterii, z udziałem którego dokonano optymalizacji statystycznej w celu wyznaczenia stabilnych okien procesowych zamiast bazowania na wpływie pojedynczych czynników. Następnie badania skierowano na bioelektrochemiczne procesy oczyszczania z udziałem społeczności mieszanych, gdzie kontrola redoks i monitoring elektrochemiczny dostarczały dodatkowych narzędzi kontroli. Ostatecznie rozprawa skoncentrowała się na interfejsie mikroorganizm–elektroda jako kluczowym wąskim gardle. Wykorzystując inżynierię interfejsu anody do poprawy wczesnej adhezji, transferu elektronów i tolerancji na wyższe ładunki barwnika, zmierzając w stronę prostszego i bardziej kontrolowanego systemu oczyszczania.

W pierwszym rozdziale eksperymentalnym skupiono się na screeningu ukierunkowanym na pozyskanie bakterii z grupy *Actinomycetes* (promieniowce) przydatnych w usuwaniu barwników syntetycznych. W przeprowadzonych testach zastosowano azowy EB oraz dwa barwniki trifenylometanowe, zieleń brylantową (Brilliant Green (BG)) i fiolet krystaliczny (Crystal Violet (CV)). Screening na podłożu stałym jest praktycznym sposobem identyfikacji izolatów, które mogą rosnąć w obecności barwników i tworzyć widoczne strefy odbarwienia. Ten etap jest użyteczny, ponieważ dostarcza potencjalnych szczepów i pokazuje, że zasób mikroorganizmów danej próbki obejmuje organizmy zdolne do transformacji różnych struktur barwników. Jednocześnie ten typ screeningu jest tylko narzędziem wstępnej selekcji. Nie potrafi on w pełni oddzielić rzeczywistej transformacji biologicznej od efektów fizycznych. Wyraźna strefa wokół kolonii może odzwierciedlać aktywność enzymów, ale może być też zależna od dyfuzji barwnika w podłożu stałym, lokalnych zmian pH, zmian redoks, sorpcji przez biomasę np. w wyniku wiązania barwnika przez polimery zewnątrzkomórkowe. Z tego powodu ten rozdział podkreśla potrzebę późniejszego testowania obiecujących szczepów w kontrolowanych układach ciekłych, z odpowiednimi próbami ślepyimi i kontrolami weryfikacyjnymi.

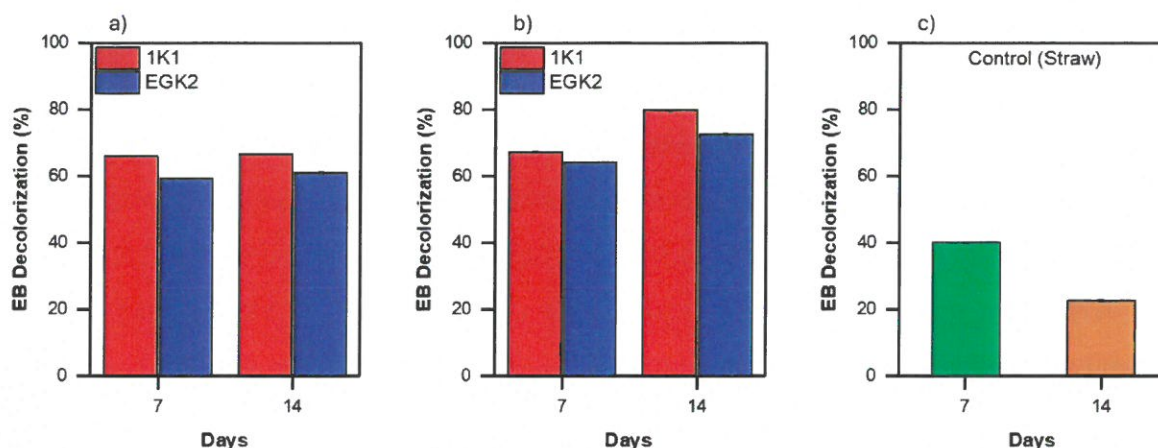
Istotną częścią pierwszego rozdziału było testowanie tanich, naturalnych nośników stałych w celu stabilizacji wzrostu biomasy i poprawy efektywności procesu. Systemy immobilizacji biomasy są szeroko stosowane w biotechnologii ścieków, ponieważ zwiększają retencję

biomasy, zmniejszają wymywanie oraz amortyzują obciążenia szokowe. Wspierają też wolno rosnące degradatory i umożliwiają dłuższy kontakt bez konieczności bardzo długich czasów retencji hydraulicznej. W oczyszczaniu barwników immobilizacja może być pomocna, ponieważ barwniki mogą hamować rozwój mikroorganizmów i spowalniać metabolizm, a immobilizacja może tworzyć bardziej ochronne mikrośrodowisko. Jednak systemy nośnikowe tworzą także problem interpretacyjny, ponieważ nośniki mogą uczestniczyć w fizycznej sorpcji barwników. Dlatego, gdy system z immobilizowaną biomasą wykazuje usunięcie barwy, ważne jest określenie, jaka część wynika z sorpcji na nośniku, a jaka z biologicznej konwersji prowadzonej przez mikroorganizmy.

W ramach badań prezentowanych w rozprawie przetestowano trzy nośniki: wióry drewna iglastego, słomę oraz zrębki drewna liściastego. Tylko słoma wspierała widoczny wzrost mikroorganizmów podczas wstępnych testów, dlatego została wybrana do głównych eksperymentów nośnikowych. Po 14 dniach sama słoma oraz sama biomasa dawały niższe wyniki usuwania barwników, natomiast słoma wraz z biomasą dawała wyższe wyniki usuwania. Sugeruje to, że nośnik poprawił wydajność, prawdopodobnie poprzez stabilizację biomasy, poprawę retencji oraz zwiększenie kontaktu między komórkami, a cząsteczkami barwnika. W tych warunkach szczep 1K1 usunął 66,6% BG i 80% EB, natomiast szczep EGK2 usunął 97,8% BG i 73% EB (Rys. 1 i 2). Wyniki te pokazują, że promieniowce mogą przyczyniać się do usuwania barwników i że tanie nośniki mogą poprawiać wydajność procesu. Jednocześnie wyniki wskazują jasno na ograniczenia interpretacyjne i procesowe. Czas potrzebny do uzyskania wysokiego poziomu usunięcia barwników jest długi, około 14 dni, a obserwowane redukcje barwy mogły odzwierciedlać zarówno mechanizmy fizyczne, jak i biologiczne.



Rysunek 1. Procentowe usunięcia trifenylometanowej zieleni brylantowej (BG) po 7 i 14 dniach a) Podłoże + biomasa, b) Podłoże + słoma + biomasa, c) Sama słoma



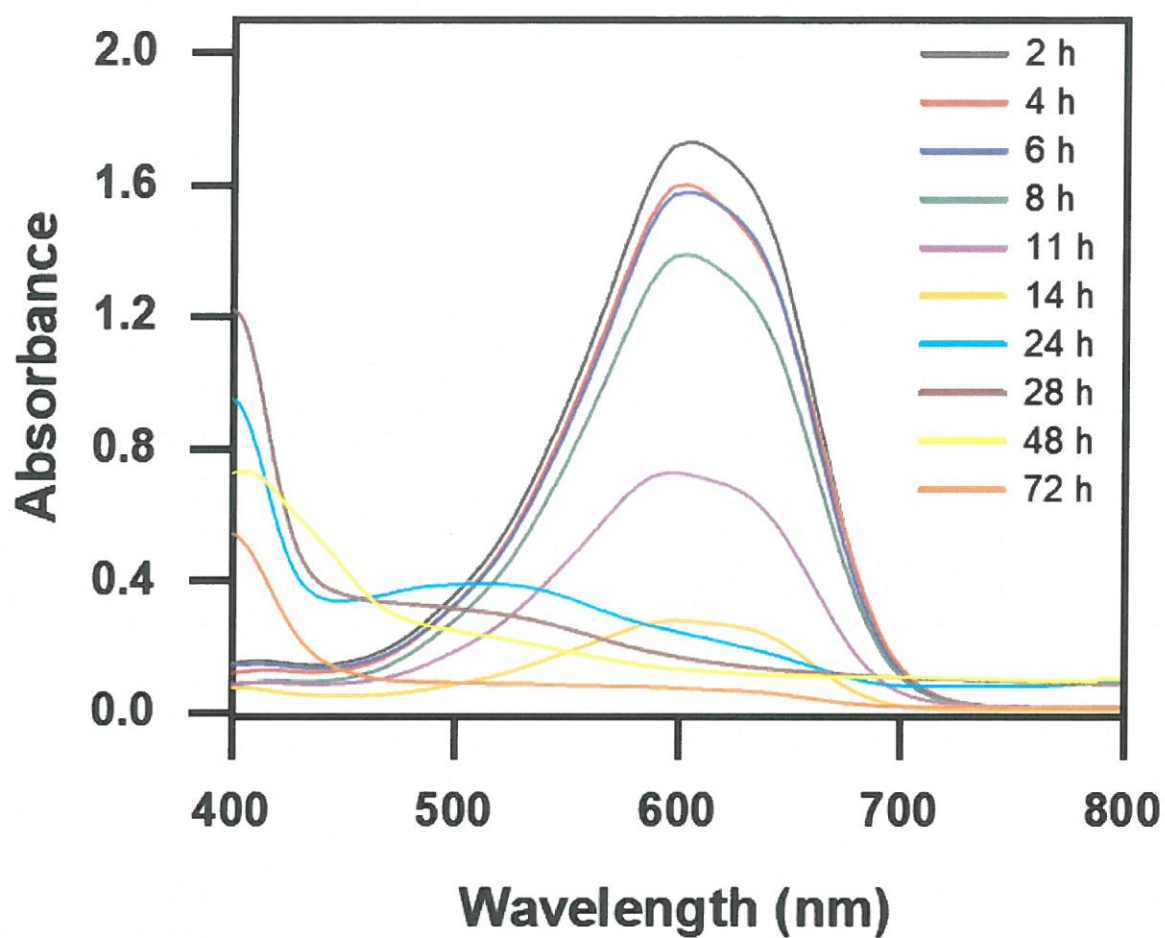
Rysunek 2. Procentowe usunięcia barwnika azowego Evans blue (EB) po 7 i 14 dniach A) Podłoże + biomasa, B) Podłoże + słoma + biomasa, C) Sama słoma

Ponieważ rozprawa koncentruje się na mechanizmach i optymalizacji warunków procesu, ten etap stanowił punkt odniesienia i uzasadniał potrzebę przejścia do kolejnego etapu, o odmiennym kierunku, w który wykorzystano organizm modelowy oraz przeprowadzono optymalizację statystyczną w celu poprawy szybkości oczyszczania i jakości dowodów.

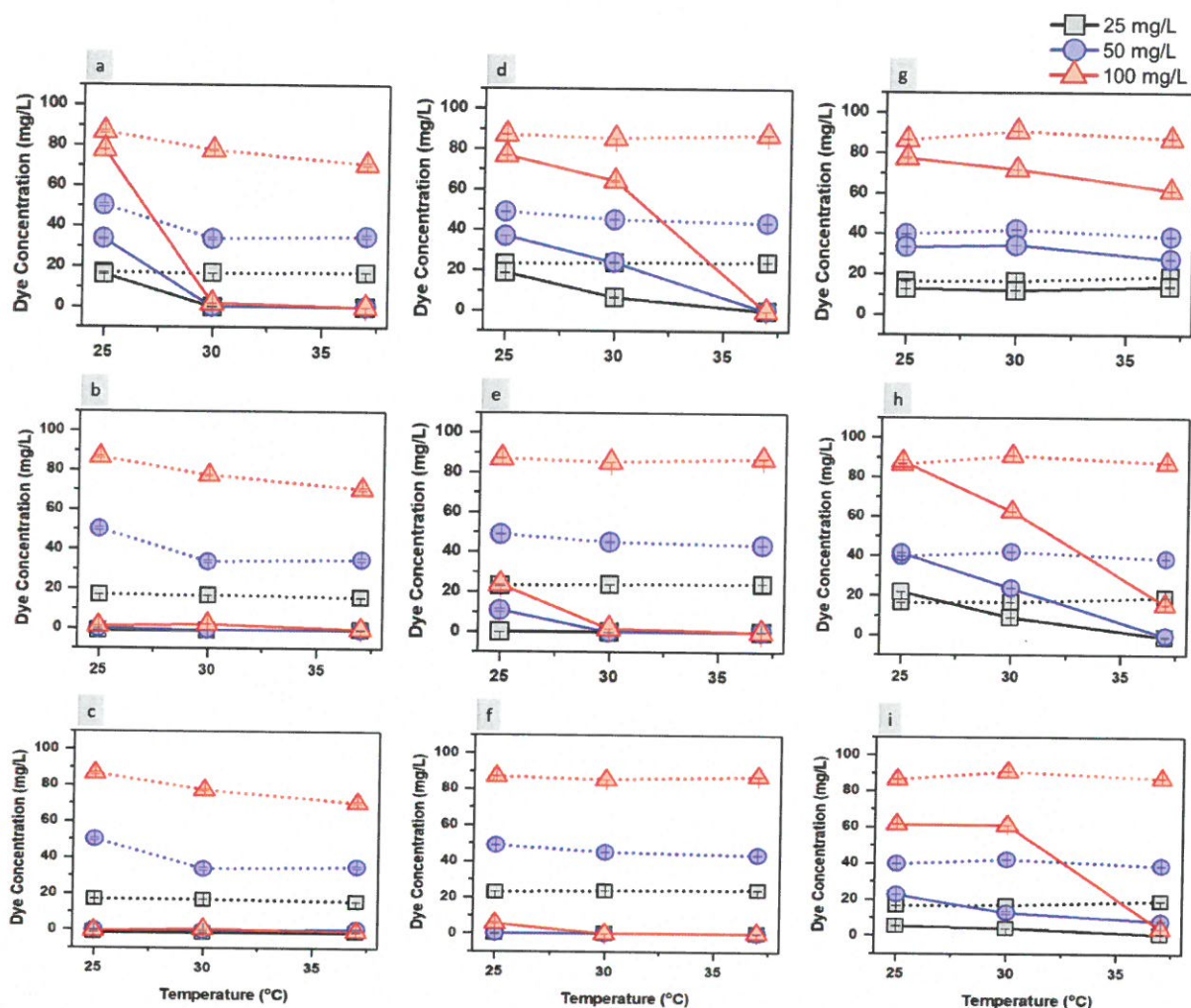
Drugi rozdział eksperymentalny rozwiązuje ograniczenia poprzedniego etapu, koncentrując się na pojedynczej, dobrze znanej bakterii modelowej o silnym znaczeniu dla układów bioelektrochemicznych, czyli *Shewanella oneidensis* MR-1. Organizm ten jest znany z pozakomórkowego transferu elektronów oraz interakcji z różnymi akceptorami elektronów. Te cechy czynią ją odpowiednią do interpretacji mechanistycznej i bezpośrednio łączą z późniejszymi etapami pracy opartymi na zastosowaniu mikrobiologicznych ogniw paliwowych. Celem tego rozdziału było zbudowanie kontrolowanych i opartych na optymalizacji ram biodegradacji EB. Zamiast testowania jednej zmiennej naraz, wykorzystano metodę Response Surface Methodology (RSM), aby ilościowo określić, jak kluczowe zmienne wpływają na szybkość i kompletność biotransformacji EB (Tab. 1). Z tego powodu zastosowano pełny plan czynnikowy 3^4 z czterema czynnikami: czas inkubacji (24–72 h), stężenie EB (25–100 mg/L), stężenie glukozy (250–1000 mg/L) oraz temperatura (25–37 °C). Zmienne te stanowią główne czynniki sterujące biologiczną konwersją barwników azowych. Czas kontroluje ekspozycję i zakończenie reakcji. Temperatura wpływa na wzrost mikroorganizmów i aktywność enzymów. Stężenie barwnika wpływa na toksyczność i zapotrzebowanie na elektrony. Dostępność donora elektronów kontroluje siłę redukcyjną potrzebną do redukcji wiązania azowego i późniejszych etapów metabolicznych.

Celem monitorowania procesu dekoloryzacji prób zastosowano spektrofotometrię UV-Vis, jednak wyniki tej metody nie były traktowane jako dowód biodegradacji. Transformację chemiczną potwierdzono dodatkowymi narzędziami analitycznymi. Metodą HPLC śledzono zanik barwnika macierzystego, dostarczając bezpośrednich dowodów, że EB jest usuwany, a nie jedynie zmienia formę swoje widmo. Metodą GC-MS identyfikowano produkty biotransformacji, pokazując, że w miarę rozkładu EB pojawiają się nowe związki. To połączone podejście wzmacnia interpretację, ponieważ oddziela utratę barwy wynikającą z rozszczepienia wiązania azowego od bardziej zaawansowanej transformacji chemicznej. Wspiera także interpretację dotyczącą szlaku przemian, łącząc redukcję barwnika macierzystego z pojawianiem się możliwych do zidentyfikowania produktów.

Połączenie wyników RSM i uzyskanego okna procesowego z analizami chemicznymi dostarcza udokumentowanego okna pracy, a nie tylko analizy wpływu jednego czynnika. Jest to ważne, ponieważ biologiczne oczyszczanie barwników często zależy od interakcji między zmiennymi. Na przykład większa ilość donora elektronów może przyspieszać redukcję wiązań azowych, ale może też zmieniać „zachowanie” się biomasy przekładające się na spadek efektywności usuwania barwnika. Wyższa temperatura może przyspieszać kinetykę, ale może wpływać na stabilizację tempa procesu. Wyższe ładunki barwnika zwiększają toksyczność i zapotrzebowanie na elektrony. Optymalizacja w oparciu o statystyczną analizę RSM i uzyskane okno procesowe, będące zdefiniowanym zakresem parametrów technologicznych, pozwalających na stabilny i powtarzalny przebieg procesu jest zdecydowanie bardziej użyteczne niż optymalizacja pojedynczego parametru. W warunkach zoptymalizowanych uzyskano prawie całkowitą dekoloryzację EB, powyżej 99% w 3 dni (Rys. 3–4). Co ważniejsze, prawdziwą degradację potwierdzono, ponieważ zaobserwowano zanik barwnika macierzystego oraz powstawanie produktów dalszej biotransformacji amin aromatycznych. Uzyskano istotne skrócenie czasu oczyszczania w porównaniu z eksperymentem opartym na immobilizacji biomasy promieniowców. Czas do pełnej dekoloryzacji skrócił się z około 14 dni w pracy opartej na nośnikach do około 3 dni w zoptymalizowanej pracy z czystą kulturą. Ponadto, gdy warunki procesu i wzrostu zostały w pełni zoptymalizowane, czysta kultura *S. oneidensis* MR-1 całkowicie zmineralizowała EB.



Rysunek 3.: Widma UV-Vis (400–800 nm) dla błękitu Evansa w próbce z *S. oneidensis* MR-1 w stężeniu 50 mg/l i temperaturze 30 °C, pobrane po 2, 4, 6, 8, 11, 14, 24, 28, 48 i 72 h. Charakterystyczny pik w okolicach 606 nm stopniowo zanika, co wskazuje na odbarwienie w czasie (K. Ayaz i in. 2026a).



Rysunek 4. Dekoloryzacja błękitu Evansa przez *Shewanella oneidensis* MR-1 przy różnych stężeniach glukozy, stężeniach barwnika, czasach inkubacji i temperaturach. Panele (a–c) przedstawiają wyniki dla stężenia glukozy 250 mg/l, (d–f) 500 mg/l i (g–i) 1000 mg/l. Każdy panel przedstawia stężenia resztkowe barwnika (mg/l) po 24, 48 i 72 godzinach przy trzech początkowych stężeniach barwnika (25, 50 i 100 mg/l) i temperaturach (25, 30 i 37°C). Linia przerywana przedstawia kontrolę abiotyczną, natomiast linia ciągła przedstawia degradację przez *Shewanella oneidensis* MR-1 (K. Ayaz i in. 2026a).

Tabela 1. Wyniki analizy wariancji (ANOVA) dla odbarwienia błękitu Evansa przez *Shewanella oneidensis* MR-1 (K. Ayaz i in. 2026a)

Term	Sum of Squares	DF	F value	P value	Significance
Model	79 371.91	14	17.32	<0.001	Significant
Time (A)	18 339.06	1	56.04	<0.001	Significant
Dye (B)	1 091.33	1	3.33	0.072	Borderline
Carbon source (C)	28 571.05	1	87.30	<0.001	Significant
Temperature (D)	18 700.79	1	57.14	<0.001	Significant

A^2	2 021.90	1	6.18	0.015	Significant
B^2	100.49	1	0.31	0.581	Not significant
C^2	1 015.80	1	3.10	0.083	Borderline
D^2	596.50	1	1.82	0.182	Not significant
$A \times B$	14.28	1	0.04	0.835	Not significant
$A \times C$	182.48	1	0.56	0.458	Not significant
$A \times D$	4 215.23	1	12.88	<0.001	Significant
$B \times C$	429.94	1	1.31	0.256	Not significant
$B \times D$	216.40	1	0.66	0.419	Not significant
$C \times D$	1 221.96	1	3.73	0.058	Borderline
Residual (Error)	21 599.01	66	—	—	—
Total	100 970.91	80	—	—	—

Model kwadratowy był statystycznie istotny ($R = 0,79$; skorygowany $R = 0,74$), co wskazuje na dobre dopasowanie do danych eksperymentalnych (Tab. 1). Czas i temperatura były głównymi pozytywnymi parametrami usuwania EB, natomiast nadmiar glukozy hamował dekoloryzację, a stężenie barwnika miało mniejszy wpływ w badanym zakresie. Wynik ten wspiera kluczowy punkt rozprawy. Czysta kultura może zapewnić głęboką konwersję, gdy warunki pracy są poprawnie zdefiniowane, a dowody są wspierane analizami chemicznymi, a nie tylko utratą barwy. Ten rozdział tworzy więc mocną podstawę do przejścia do układów bioelektrochemicznych, ponieważ ustanawia organizm modelowy, statystycznie wspierane okno procesowe oraz strategię weryfikacji, która łączy dekoloryzację z rzeczywistą transformacją chemiczną.

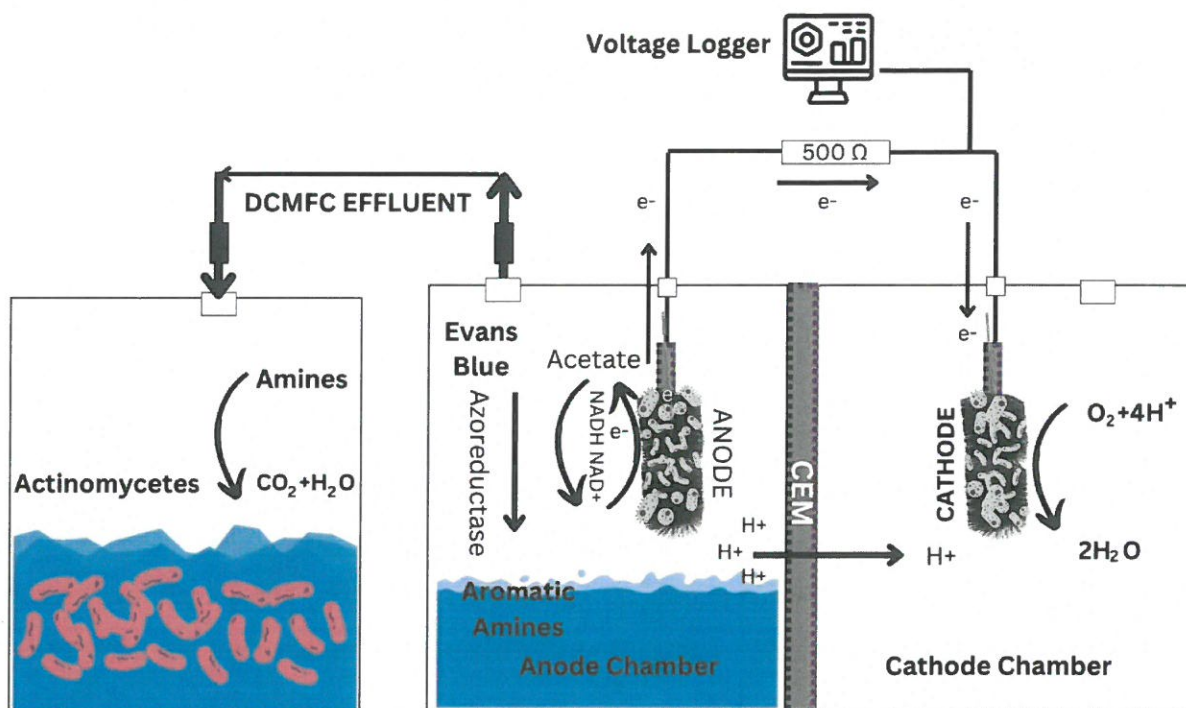
W trzecim rozdziale eksperymentalnym dysertacji skupiono się na bardziej inżynierskiej propozycji układu oczyszczania. Badano usuwanie EB w systemie zintegrowanym, który łączy dwukomorowe mikrobiologiczne ogniwo paliwowe (DCMFC) z bioreaktorem tlenowym (Rys. 5). Rozdział ten odniósł się do praktycznej rzeczywistości, w której przemysłowe ścieki barwnikowe często mają wyższe ładunki barwnika i bardziej złożony skład niż uproszczone testy laboratoryjne. W projektowaniu układu wzięto pod uwagę znane z literatury etapy biotransformacji barwników azowych. Warunki beztlenowe lub o niskim potencjale redoks wspierają redukcyjne rozszczepienie wiązania azowego, natomiast warunki tlenowe wspierają utlenianie zredukowanych produktów pośrednich. W DCMFC komora anody zapewnia

środowisko o niskim redoks, które wspiera redukcję wiązania azowego. Jednocześnie MFC umożliwia odzysk energii generując prąd elektryczny. Następnie tlenowe doczyszczanie utlenia zredukowane produkty pośrednie i pozostałe związki organiczne, wspierając pełną mineralizację.

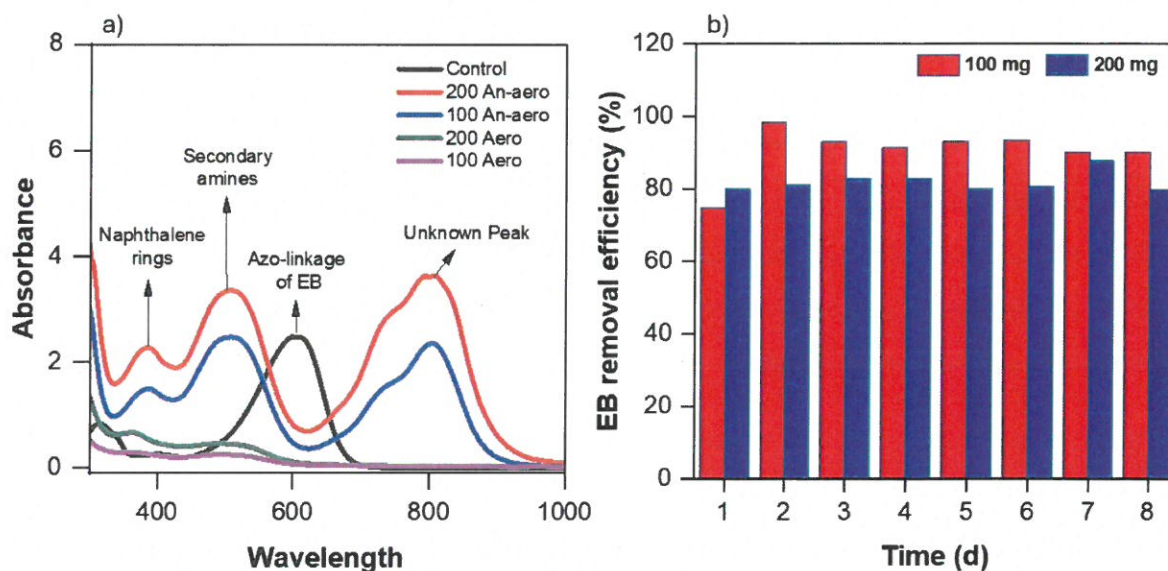
Jako inokulum dla anody DCMFC zastosowano mieszany osad beztlenowy z oczyszczalni ścieków. EB testowano przy stężeniach początkowych 100 i 200 mg/L. Zwiększa to trudność oczyszczania w porównaniu z wcześniejszymi eksperymentami i sprawdza wydajność przy wyższym stresie barwnikowym. W etapie tlenowym zastosowano dwa szczepy bakterii z grupy promieniowców wyizolowane z kompostu ogrodowego. Ta społeczność tlenowa została dobrana w celu wspierania utleniania produktów pośrednich o charakterze aromatycznym, powstających podczas beztlenowej redukcji barwników azowych. Ten zintegrowany układ miał łączyć szybką dekoloryzację z pełną mineralizacją poprzez etapowanie procesu.

Interpretacje wyników dekoloryzacji wzmocniono analizami elektrochemicznymi i analizami metagenomowymi obrazującymi zmiany w obrębie społeczności mikroorganizmów tworzących biofilm na anodzie. Analizy UV-Vis służyły do oceny kinetyki dekoloryzacji. Elektrochemiczna Spektroskopia Impedancyjna (EIS) oceniała opory ogniwa i anody oraz pomagała identyfikować ograniczenia transferu ładunku. Woltamperometria cykliczna (CV) dostarczyła informacji o aktywności elektrochemicznej związanej z procesami biofilmu. Sekwencjonowanie 16S rRNA scharakteryzowało skład i zmiany w społeczności mikroorganizmów. Razem narzędzia te łączyły wydajność oczyszczania z procesami elektrochemicznym i zmianami społeczności, dając pełniejszy obraz procesów zachodzących w biofilmie osadzonym na anodzie.

Zintegrowany system wykazał wysoką skuteczność. Dla 100 mg/L EB dekoloryzacja mieściła się w zakresie od $90 \pm 2\%$ do $98 \pm 1,9\%$. Dla 200 mg EB/L dekoloryzacja mieściła się w zakresie od $79 \pm 2\%$ do $87 \pm 1\%$ (Rys. 6). Analiza społeczności wykazała wysoką obecność *Pseudomonadota*, z 45,5% w kulturach zaaklimatyzowanych do barwnika i 32% w kulturach inokulum, oraz *Actinomarinicola* (13,75%), *Thermochromatium* (4,82%) i *Geobacter* (4,52%). Wyniki potwierdziły zdolność układu DCMFC wraz z bioreaktorem tlenowym do szybkiego usuwania EB oraz wspierania mineralizacji poprzez tlenowe doczyszczanie, przy jednoczesnym odzysku energii.



Rysunek 5. Schematyczny diagram dwukomorowego ogniwa paliwowego (DCMFC) w połączeniu z układem tlenowym (K. Ayaz i in. 2024)



Rysunek 6 a) Widma absorpcji UV-Vis dla stężeń 100 mg/l i 200 mg/l dla prób z beztlenowej komory DCMFC, czystego roztworu barwnika (kontrola) i ścieków oczyszczonych tlenowo. (b) Odbarwianie EB w DCMFC w czasie (K. Ayaz i in. 2024)

W trzecim etapie badań wskazano także wyraźne ograniczenia, które motywowały do poszukiwania dalszych rozwiązań i optymalizacji procesu usuwania EB (zakres i wyniki kolejnych eksperymentów zawarto w czwartym, ostatnim rozdziale eksperymentalnym). W

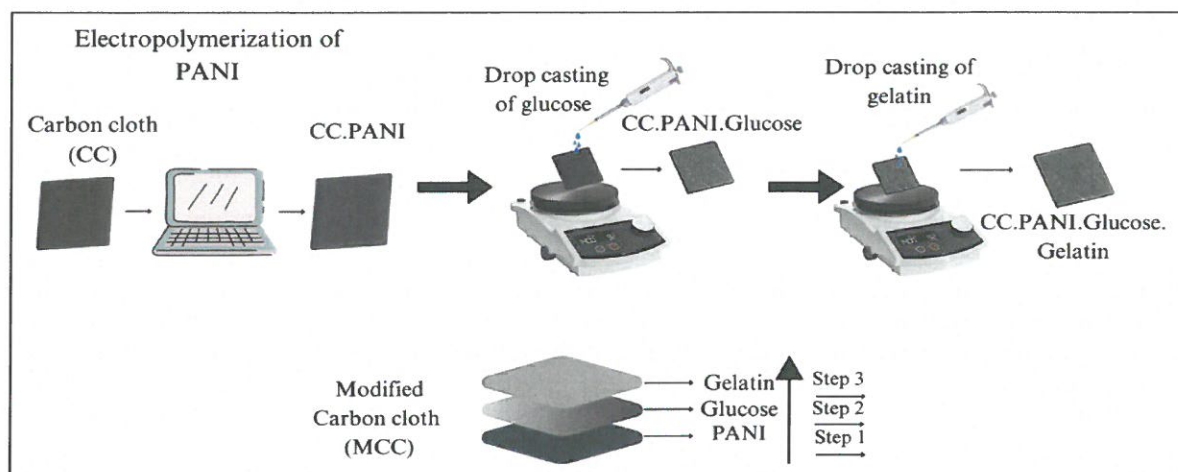
etapie badań z DCMFC wprowadzone zmiany inżynieryjno-procesowe pozwoliły na skrócenie czasu dekoloryzacji z około 3 dni do około 20–24 godzin i umożliwiły pełną mineralizację poprzez dodanie wtórnego etapu tlenowego. Zastosowano również 200 mg/L początkowego stężenia EB, co było wyższe niż we wcześniejszych rozdziałach. Jednak pozostały trzy kluczowe ograniczenia: czas rozruchu był długi, około 30 dni aklimatyzacji biofilmu przed stabilną pracą i przed rozpoczęciem eksperymentów z EB; tlenowe doczyszczanie zwiększyło zapotrzebowanie na energię i złożoność procesu; oraz interpretacja mechanistyczna była trudniejsza w społecznościach mieszanych. Kwestie te są ważne dla skalowalności i kontroli i stały u podstaw kolejnego pytania postawionego w rozprawie: czy prostszy system z czystą kulturą może osiągnąć podobną lub lepszą wydajność, jeśli zostanie rozwiązane główne ograniczenie bioelektrochemiczne na anodzie?

Ostatni rozdział eksperymentalny koncentrował się na rozwiązaniu powyższych ograniczeń poprzez inżynierię interfejsu mikroorganizm–elektroda. W mikrobiologicznych ogniwach paliwowych powierzchnia anody kontroluje wczesną adhezję, wzrost biofilmu i pozakomórkowy transfer elektronów. Słaba adhezja opóźnia rozruch. Wysoki opór transferu ładunku na interfejsie ogranicza szybkość reakcji i odzysk elektronów. Ponadto czyste kultury mogą być bardziej wrażliwe na stres barwnikowy niż społeczności mieszane. Dlatego poprawę powierzchni anody traktowano jako bezpośrednie narzędzie inżynierskie do skrócenia rozruchu, poprawy wydajności i zwiększenia tolerancji na wyższe ładunki barwnika, przy jednoczesnym utrzymaniu prostoty systemu i łatwiejszej interpretacji.

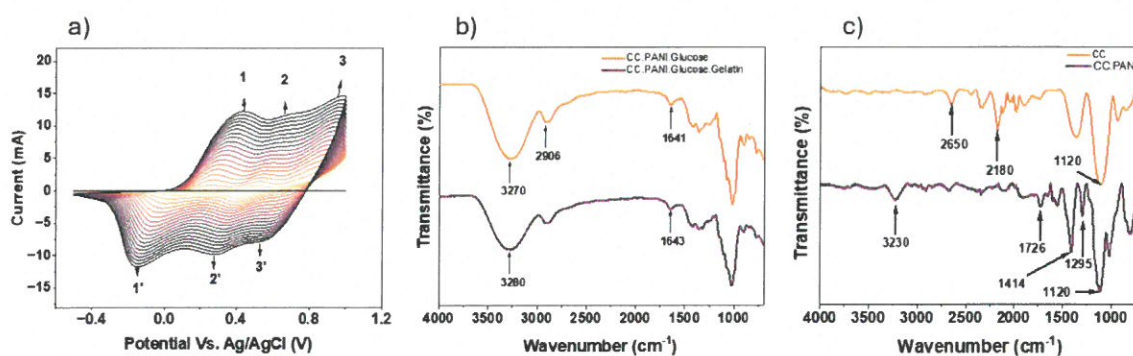
W tej pracy anodę z tkaniny węglowej modyfikowano sekwencyjnie warstwą polianiliny (PANI), warstwą glukozy oraz ochronną warstwą żelatyny (Rys. 7). Każda warstwa pełniła określoną rolę. PANI poprawiała przewodność i wspierała lepszy transport ładunku. Warstwa glukozy działała jako lokalny sygnał węglowy, który wspierał wczesną kolonizację i tworzenie biofilmu. Warstwa żelatyny chroniła glukozę i spowalniała jej ekspozycję, zmniejszając szybkie wymywanie do roztworu i wydłużając korzyści w fazie początkowej. Powłokę zweryfikowano za pomocą CV podczas elektropolimeryzacji PANI oraz analiz powierzchniowych, takich jak FTIR, SEM i XPS. Wydajność mierzono przy użyciu CV, EIS i CSC, wraz z oceną pokrycia biofilmem i żywotności.

Wyniki wykazały wyraźne różnice między układem z glukozą dostępną w roztworze objętościowym, a glukozą umieszczoną na powierzchni elektrody. Gdy glukoza była obecna głównie w roztworze (CC.G.B), bakterie miały tendencję do wzrostu w fazie ciekłej, co

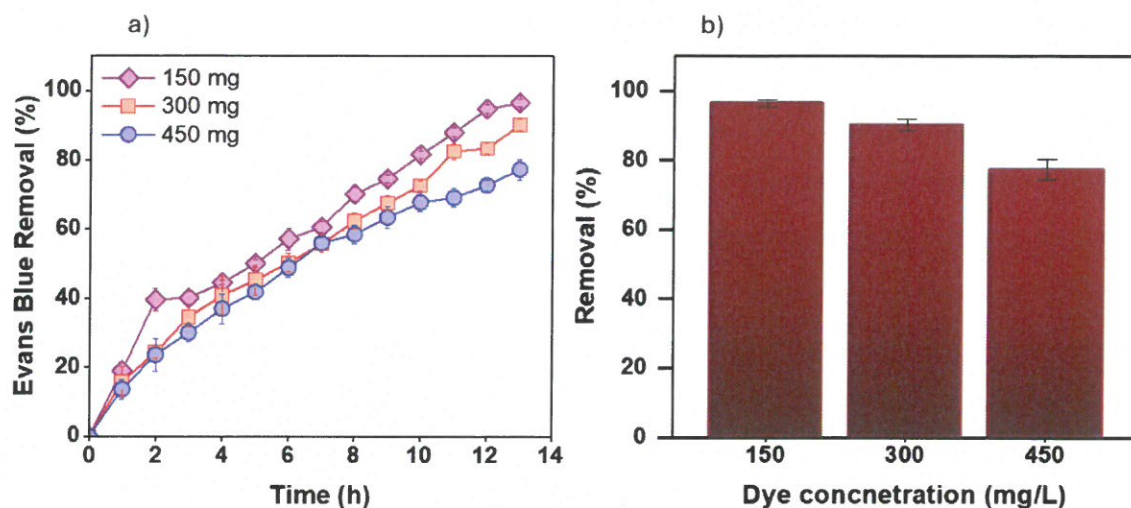
ograniczało stabilną adhezję. Natomiast zmodyfikowana anoda (MCC.B) wykazała najwyższe tworzenie biofilmu ($90,2 \pm 0,2\%$) oraz najwyższy CSC ($174,9 \pm 10,2 \text{ mC/cm}^2$), co było znacznie wyższe niż dla niezmodyfikowanej tkaniny węglowej z biofilmem (CC.B, $3,3 \pm 0,3 \text{ mC/cm}^2$). Wspiera to wniosek, że sygnały powierzchniowe i przewodzące powłoki poprawiają wzrost biofilmu i zmniejszają ograniczenia interfejsowe, co usprawnia transfer elektronów i skraca rozwój we wczesnym etapie (Rys. 8).



Rysunek 7. Schematyczne przedstawienie modyfikacji elektrody (K. Ayaz i in. 2026b).



Rysunek 8. (a) Cykliczny woltamogram przedstawiający elektrochemiczną polimeryzację aniliny na powierzchni tkaniny węglowej. (b-c) Widma FTIR próbek eksperymentalnych, obejmujących (c) tkaninę węglową (CC), CC elektropolimeryzowaną z PANI (CC.PANI) i (b) CC-PANI powlekaną glukozą (CC.PANI.Glucose) i warstwą ochronną żelatyny (CC.PANI.Glucose.Gelatin, określaną jako MCC) (K. Ayaz i in. 2026b).



Rysunek 9. (a) Procentowe usunięcie barwnika EB w czasie w SCMFC dla początkowych stężeń barwnika EB wynoszących 150, 300 i 450 mg/l (b) Maksymalne usunięcie barwnika EB dla wszystkich stężeń

Zmodyfikowaną anodę przetestowano następnie w jednokomorowym mikrobiologicznym ogniwie paliwowym (SCMFC), które ma prostszą konstrukcję niż system dwukomorowy DCFMC. W SCMFC zmodyfikowany interfejs osiągnął w 13 godzinie pracy efektywność usunięcia barwnika EB na poziomie około 96 do 97% przy stężeniu EB 150 mg/L, około 90–91% przy stężeniu EB 300 mg/L i 73% usunięcia przy 450 mg/L (Rys. 9). Wskazuje to na możliwość szybszego usuwania barwnika w porównaniu z wcześniejszym 24-godzinny systemem opartym na DCMFC. Wskazuje także na wyższą tolerancję na obciążenie barwnikiem, ponieważ stabilną pracę uzyskano przy 450 mg/L, podczas gdy wcześniej obserwowano hamowanie i prawdopodobną toksyczność powyżej 200 mg/L. Dane GC-MS wskazały degradację do mniej toksycznych produktów, głównie niskocząsteczkowych kwasów, takich jak kwas 3-metylobutanowy i kwas oktanowy i osiągnięto to bez dodawania tlenowego etapu doczyszczania. Wspiera to cel rozprawy, którym jest przejście w stronę prostszego, szybszego i bardziej kontrolowanego bioelektrochemicznego systemu dla głębokiej transformacji EB.

Podsumowując, rozprawa przedstawia jasną i spójną ścieżkę oczyszczania barwników azowych na przykładzie trwałego sulfonowanego barwnika azowego EB. Zaczyna się od screeningu mikroorganizmów i testowania nośników w dekoloryzacji barwników z grup trifenylometanów i azowych, co buduje zasób szczepów i podkreśla znaczenie rozdzielania sorpcji od biodegradacji oraz zwraca uwagę na problem długich czasów inkubacji. Następnie wykorzystuje czystą kulturę i optymalizację statystyczną do wyznaczenia odpornego okna procesowego (pracy) oraz potwierdza transformację za pomocą HPLC i GC-MS. Kolejny etap

to DCMFC z udziałem społeczności mieszanej połączony z tlenowym doczyszczaniem, który umożliwia szybkie oczyszczanie i pełną mineralizację, ale ujawnia ograniczenia rozruchu i złożoności. Na koniec praca rozwiązuje kluczowe wąskie gardło bioelektrochemiczne poprzez inżynierię interfejsu anody, co poprawia adhezję, transfer elektronów, wydajność rozruchu oraz tolerancję na wyższe ładunki barwnika w prostszym układzie SCMFC. Ogólny wkład obejmuje nie tylko wykazanie wysokiej skuteczności usuwania, ale połączenie mechanizmów biologicznych z narzędziami operacyjnymi, umożliwiając jaśniejszą interpretację i bardziej praktyczne wdrożenie biologicznych i bioelektrochemicznych systemów oczyszczania ścieków barwnikowych.

*Tabela 2 Zestawienie wyników usuwania EB w poszczególnych etapach badań: testowany system/konfigurację, zakres obciążenia EB (mg/l), czas obróbki, wydajność odbarwiania/usuwania i kluczowe wnioski (od screeningu i zastosowania promieniowców zawieszonych i immobilizowanych, poprzez czysty szczep *Shewanella oneidensis* MR-1 i optymalizację procesu przy użyciu RSM, DCMFC w fazie redoks z doczyszczaniem tlenowym, do intensyfikacji SCMFC za pomocą zaprojektowanego biointerfejsu anodowego).*

Etap eksperymentu	System / Mikroorganizm	stężenie barwnika mg/L	Max Decoloryzacja (%)	czas (d/h)	Kluczowe wnioski
etap1 <i>Actinomyces</i> – screening, immobilizacja	izlowane szczepy <i>Actinomyces</i> , immobilizacja na słomie	45	80 (IK1) 73 (EGK2)	14 d	Procentowe usunięcie w zależności od nośnika, stężenia barwnika i jego rodzaju
Stage 2: <i>Shewanella</i> , optymalizacja RSM	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 (czysta kultura)	25–100	>99.0	24– 72 h	GC–MS/HPLC: Powstawanie kwasów aromatycznych i krótkołańcuchowych, całkowitą mineralizacją
etap 3: system zintegrowany (hybrydowy)	układ hybrydowy DCMFC z kulturą mieszaną w połączeniu z układem tlenowym i <i>Actinomyces</i>	100 200	98.0 87.0	20- 24 h	16S rRNA: dominacja <i>Pseudomonadota</i> ; całkowita mineralizacja
Etap 4: inżynieria elektrody (anody)	SCMFC z modyfikowaną powierzchnią anody (modyfikowana powierzchnia tkaniny węglowej (MCC.B))	150 300 450	96.56 90.22 77.28	13 h	Szybkie usuwanie EB, GC–MS: kwas 3-metylobutanowy i oktanowy z niepełną mineralizacją

2. Odniesienia do głównych publikacji autora

Niniejsza rozprawa jest powiązana z tematycznymi publikacjami:

- Ayaz, K., Zabłocka-Godlewska, E., Shakibania, S., Patel, T., Karoń, K., & Krukiewicz, K. (2026b). Enhancing Microbial Adhesion and Electron Transfer of *Shewanella oneidensis* MR-1 with Polyaniline-Glucose-Gelatin Coating for Bioelectrochemical Applications. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2026.121546>
- Ayaz, K., Zabłocka-Godlewska, E., Smółka, S., Kudlek, E., Hussain, I., & Ilyas, M. (2026a). Sustainable biodegradation of Evans blue (Direct Blue 53) by *Shewanella oneidensis* MR-1: Response surface optimization and product analysis. *Journal of Water Process Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2025.109399>
- Ayaz, K., Zabłocka-Godlewska, E., & Li, C. (2024). Enhancing Azo Dye Mineralization and Bioelectricity Generation through Biocathode-Microbial Fuel Cell Integration with Aerobic Bioreactor. *Energies*, 17(19), 4896. <https://doi.org/10.3390/en17194896>
- Ayaz, K., & Zabłocka-Godlewska, E. (2022). Screening of Actinomycetes decolorizing the synthetic dyes from rotten poplar wood and garden compost. In *Contemporary Problems of Power Engineering and Environmental Protection* (pp. 119–131).

