

Częstochowa, dn. 16.06.2026 r.

Dr hab. inż. Ewa Wiśniowska, prof. PCz.

Katedra Sieci i Instalacji Sanitarnych

Wydział Infrastruktury i Środowiska

Politechnika Częstochowska

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Kamrana Ayaza

**pt. „Application of Pure and Mixed Cultures of Bacteria Strains in Synthetic Dyes
Removal Processes – Mechanisms and Optimisation of Process Conditions”**

Promotor: dr hab. Ewa Zabłocka-Godlewska, prof. PŚ

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana na Wydziale Inżynierii Środowiska i Energetyki Politechniki Śląskiej, w Katedrze Ochrony Powietrza, pod kierunkiem naukowym dr hab. Ewy Zabłockiej-Godlewskiej, prof. PŚ. Recenzję opracowano zgodnie z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z uwzględnieniem wymagań określonych w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. 2024, poz. 1571, z późn. zm.), a także standardów przyjętych dla ocen rozpraw doktorskich w dyscyplinie inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka. Podstawę opracowania recenzji stanowił przekazany egzemplarz rozprawy doktorskiej.

Tematyka pracy i aktualność problemu badawczego

Syntetyczne barwniki azowe stanowią jedno z najpoważniejszych współczesnych zagrożeń dla jakości wód powierzchniowych i ścieków przemysłowych. Przemysł

Politechnika Częstochowska

Wydział Infrastruktury i Środowiska

ul. Dąbrowskiego 73, 42-201 Częstochowa

tel. +48 34 325 04 63, e-mail: biuro.dziekana.wiis@pcz.pl

wis.pcz.pl



tekstylny odprowadza do środowiska szacunkowo od 10 do 15 % całkowitej ilości zużytych barwników w postaci nieoczyszczonych lub niedostatecznie oczyszczonych ścieków. Klasyczne oczyszczalnie ścieków komunalnych nie usuwają tych związków ponieważ ich stabilność chemiczna i charakter anionowy sprawiają, że konwencjonalne metody biologiczne, fizyczne i chemiczne wykazują jedynie ograniczoną skuteczność.

Doktorant trafnie zidentyfikował jeden z kluczowych problemów badawczych: sam zanik barwy ścieków oceniany metodą UV-Vis jest niewystarczającym kryterium efektywności oczyszczania. Mechanizmy biosorpcji, fizycznej adsorpcji i częściowego rozszczepienia chromoforu mogą prowadzić do pozornej dekoloryzacji bez rzeczywistej transformacji chemicznej. Autor trafnie sformułował ten problem, wskazując, że skuteczne oczyszczanie musi prowadzić do potwierdzonej chemicznie transformacji. Ta obserwacja stanowi oś, wokół której zbudowany jest cały projekt badawczy. Wybór jako barwnika Evans Blue jest w pełni uzasadniony; gdyż ten należy on do najtrudniejszych do usunięcia anionowych barwników diazowych. Zastosowanie mikrobiologicznych ogniw paliwowych (MFC) do jednoczesnego oczyszczania ścieków i odzysku energii elektrycznej wpisuje się natomiast w główny nurt zielonej biotechnologii. Tematyka rozprawy jest zbieżna z aktualnymi priorytetami programu Horizon Europe w obszarach czystych technologii wodnych i przemysłowej biotechnologii, co podkreśla jej wartość aplikacyjną.

Ocena formalna i merytoryczna pracy

Rozprawa liczy 198 stron formatu A4. Zasadnicza część merytoryczna obejmująca wstęp, materiały i metody, wyniki i dyskusję, wnioski, kierunki przyszłych badań oraz materiały uzupełniające opracowana została na stronach od 1 do 168, po których zamieszczono bibliografię. Praca została napisana w języku angielskim. Dołączone streszczenie w języku polskim spełnia wymogi formalne określone przez ustawę. Rozprawa posiada przejrzystą, logicznie skomponowaną strukturę siedmiu rozdziałów głównych. Autor zaprojektował wieloetapowy eksperyment, w którym każda część ma wyraźnie zdefiniowaną funkcję. Narastanie złożoności układów badawczych - od czystych kultur na nośnikach stałych, przez optymalizowane hodowle modelowe,

aż po zintegrowane systemy bioelektrochemiczne - świadczy o przemysłanej logice badawczej. Rozdział wstępny pełni funkcję rozbudowanego przeglądu literaturowego i kończy się precyzyjnym sformułowaniem celów i hipotez. Rozdział materiały i metody jest bardzo dobrze opracowany i można go uznać za wzorcowy z punktu widzenia powtarzalności badawczej. Omówienie i dyskusja wyników obejmuje cztery moduły eksperymentalne. Każdy kolejny etap jest logicznie zaprojektowany. Rozprawa nie jest kompilacją czterech odrębnych procedur badawczych, lecz spójnym programem. Całość rozprawy dopełniają rozdziały: wnioski, kierunki przyszłych badań i materiały uzupełniające.

Cele rozprawy zostały sformułowane precyzyjnie i na wysokim poziomie świadomości metodologicznej. Celem pracy było opracowanie i integracja metod usuwania barwników syntetycznych ze szczególnym uwzględnieniem Evans Blue. Cele szczegółowe i hipotezy zostały zapisane wprost, a nie zrekonstruowane z wyników, co stanowi cechę dobrze zaplanowanego, dojrzałego programu badawczego. Przegląd literatury jest obszerny, dobrze zaplanowany i ukierunkowany na zagadnienia ściśle powiązane z tematyką badań. Autor wykazał dogłębną znajomość mechanizmów biochemicznych dekoloryzacji barwników, precyzyjnie rozróżniając między enzymatyczną biotransformacją a procesami elektrochemicznymi, biosorpcją i biowytrącaniem. Szczególnie wartościowe są rozdz. 1.5–1.6, omawiające mechanizmy dekoloryzacji oraz rozkładu barwników, jak też czynniki wpływające na efektywność egradacji. Autor trafnie zidentyfikował lukę badawczą: brak prac łączących dobór mikroorganizmów, mechanistyczne potwierdzenie transformacji chemicznej, optymalizację statystyczną i bioelektrochemiczną kontrolę procesu. Autor korzystał z aktualnej literatury (dominują prace z lat 2022–2025). Bibliografia jest obszerna i poprawnie sformatowana. Jako niewielkie uchybienie można wskazać zbyt pobieżne omówienie aspektów skalowania systemów MFC i ekonomiki procesu, jednak zważywszy na zakres i jakość pracy zastrzeżenie to ma charakter jedynie postulatyczny.

Warsztat metodologiczny zaprezentowany w rozdz. 2 jest imponujący zarówno pod względem zakresu, jak i poprawności stosowanych technik. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że metody nie zostały zestawione przypadkowo, lecz tworzą spójny układ

dowodowy: metoda UV-Vis do śledzenia zaniku chromoforu, HPLC do oceny zaniku związku macierzystego, GC-MS do identyfikacji produktów transformacji, CV i EIS do opisu biointerfejsu, FTIR i XPS do potwierdzenia etapów modyfikacji anody, SEM i CLSM do oceny morfologii i żywotności biofilmu oraz sekwencjonowanie 16S rRNA do interpretacji funkcjonalnej mikroorganizmów. Taki zintegrowany układ jest rzadko spotykany w pracach doktorskich i zasługuje na bardzo wysoką ocenę. Szczególnie wartościowe jest zastosowanie RSM w wariancie pełnego planu czynnikowego (cztery czynniki: czas, stężenie barwnika, stężenie źródła węgla, temperatura) do optymalizacji warunków biodegradacji Evans Blue przez *S. oneidensis* MR-1. Autor nie ograniczył się do optymalizacji jednego parametru, lecz jednocześnie analizował efekty główne i interakcje. Pozytywnie oceniam także wykonanie niezależnego eksperymentu walidacyjnego w warunkach optymalnych. Pomiary były prowadzone w trzech powtórzeniach i raportowane jako średnia $\pm$ SD. Potwierdzenie rzeczywistej transformacji chemicznej Evans Blue przez *S. oneidensis* MR-1 za pomocą HPLC (zanik sygnału macierzystego barwnika) i GC-MS (identyfikacja produktów transformacji, w tym aromatycznych związków pośrednich oraz niskocząsteczkowych kwasów 3-metylobutanowego i oktanowego) stanowi mocny dowód na biodegradację, a nie tylko biosorpcję lub adsorpcję fizyczną. Jest to jeden z najistotniejszych wkładów rzetelności metodologicznej.

Jako główną uwagę krytyczną należy wskazać niepełną identyfikację wszystkich polarnych, sulfonowanych produktów pośrednich w układzie SCMFC – GC-MS, który nie wychwytuje frakcji silnie polarnej. Brakuje też pełnego bilansu TOC/ChZT pozwalającego potwierdzić całkowitą mineralizację. Ograniczenia te autor sam identyfikuje i wskazuje je jako kierunek przyszłych badań.

Oceny uzyskanych wyników i ich dyskusji dokonano w podziale na cztery moduły. Moduł I (rozdz. 3.1) zawiera wyniki oceny zastosowania immobilizowanych promieniowców do usuwania barwników azowych. Wyniki screeningu promieniowców są wartościowe nie dlatego, że dały najlepsze efekty, lecz dlatego, że pokazały, dlaczego prosty model nie wystarcza. Wykazanie roli fizycznej sorpcji na nośnikach słomianych, częściowa desorpcja barwnika, nieproporcjonalnie wysoka skuteczność układu

„słoma + biomasa” w porównaniu do każdego składnika osobno, wskazuje pułapkę interpretacyjną stosowania wyłącznie UV-Vis.

Moduł II (rozdz. 3.2). Jest to bardzo istotny rozdział rozprawy. Osiągnięta ponad 99% dekoloryzacja Evans Blue przez *S. oneidensis* MR-1 w warunkach zoptymalizowanych, połączona z potwierdzeniem zaniku sygnału macierzystego barwnika w HPLC i identyfikacją ścieżki degradacji GC-MS, dostarcza pierwszego w literaturze tak kompleksowego dowodu na rzeczywistą biodegradację Evans Blue przez czystą kulturę bakteryjną. Jako czynniki najsilniej oddziałujące zidentyfikowano czas i temperaturę. Skrócenie czasu procesu z 14 dni (moduł I) do ok. 3 dni stanowi bardzo znaczącą poprawę wydajności. Okno operacyjne RSM (czas: 24–72 h, stężenie barwnika: 25–100 mg/dm³, źródło węgla: 250–1000 mg/dm³, temperatura: 25–37°C) ma bezpośrednie znaczenie aplikacyjne.

Moduł III (rozdz. 3.3). Przejście do układu DCMFC sprzężonego z aerobowym bioreaktorem jest dobrze uzasadnione. Uzyskane wyniki są bardzo dobre: efektywność dekoloryzacji od 90 ± 2% do 98 ± 1.9% dla 100 mg/dm³ Evans Blue i od 79 ± 2% do 87 ± 1% dla 200 mg/dm³ w ciągu 20–24 godzin. Maksymalna gęstość mocy rzędu 119.2 mW/m² potwierdza, że układ nie tylko usuwa zanieczyszczenie, ale rzeczywiście pracuje jako MFC. Identyfikacja kluczowych rodzajów mikroorganizmów (*Geobacter* odpowiedzialny za transfer elektronów; *Actinomarinicola* i *Thermochromatium* za etap tlenowy) na podstawie sekwencjonowania 16S rRNA dostarcza cennych informacji odnośnie mechanizmów procesu. Autor właściwie wskazuje koszt uzyskanej poprawy: długi etap aklimatyzacji (ok. 30 dni) i większa złożoność procesu.

Moduł IV (rozdz. 3.4). Jest to najbardziej innowacyjny element pracy. Autor nie zmienia tu ani mikroorganizmu, ani podstawowej idei procesu, lecz świadomie projektuje granicę faz mikroorganizm - elektroda. Wykazano, że modyfikacja tkaniny węglowej (CC) polianiliną (PANI), glukozą i żelatyną (elektroda MCC) prowadzi do 50-krotnego wzrostu CSC (174.9 ± 10.2 vs. 3.3 ± 0.3 mC/cm²), pokrycia biofilmem 90.2 ± 0.2% i skrócenia czasu dekoloryzacji Evans Blue do 13 godzin przy 150 mg/dm³, z zachowaniem skuteczności przy stężeniach dotychczas uważanych za inhibitujące (do 450 mg/dm³). Kluczowe jest spostrzeżenie, że glukoza zlokalizowana w pobliżu

anody i stabilizowana żelatyną promuje tworzenie biofilmu sprzężonego z elektrodą. Wyniki analizy FTIR, XPS i SEM dobrze potwierdzają kolejne etapy funkcjonalizacji powierzchni, a EIS i CV korelują te zmiany z poprawą parametrów bioelektrochemicznych.

Dyskusja jest prowadzona rzetelnie. Autor skonfrontował własne wyniki z literaturą z zachowaniem ostrożności interpretacyjnej proponowaną ścieżkę degradacji Evans Blue określając jako „functional class pathway”, a nie w pełni zidentyfikowany szlak. Warto odnotować, że nie wykazano wysokiego ryzyka tworzenia amin aromatycznych, co jest istotnym argumentem w ocenie bezpieczeństwa środowiskowego procesu.

Wnioski zostały sformułowane zwięźle i precyzyjnie. Autor przedstawił spójny obraz procesu, wskazując na postępującą poprawę trzech kluczowych parametrów: czasu dekoloryzacji (od 14 dni do 13 godzin), początkowego stężenia barwnika (od 100 do 450 mg/dm³) i stopnia potwierdzenia transformacji chemicznej. Wnioski nie są jedynie wyliczeniem wartości liczbowych, lecz zawierają merytoryczną interpretację uwzględniającą mechanizmy procesów.

Rozdział dotyczący kierunków przyszłych badań jest zwarty i precyzyjny. Autor wskazuje na cztery główne obszary: optymalizację reaktora i biointerfejsu MFC, pełny bilans węglowy i ocenę toksyczności produktów końcowych, testy z wykorzystaniem rzeczywistych ścieków tekstylnych oraz skalowanie systemu. Są to realistyczne priorytety, wynikające wprost ze zidentyfikowanych ograniczeń własnych badań. W mojej ocenie autor realistycznie postrzega opracowaną technologię - jej potencjał aplikacyjny jest wysoki, lecz gotowość wdrożeniowa pozostaje na poziomie laboratoryjno-rozwojowym.

Rozprawa jest napisana poziomie odpowiednim dla czasopism z listy JCR, co zostało potwierdzone publikacją trzech artykułów ($IF \geq 3.4$). Terminologia techniczna i biologiczna jest używana konsekwentnie i poprawnie. Opracowanie graficzne pracy jest staranne; schematy mechanistyczne, jak proponowana ścieżka degradacji Evans Blue w SCMFC- CC, integrują dane z różnych technik analitycznych w czytelne schematy.

W części przypadków narracja opisowa jest nieco zbyt rozbudowana kosztem syntetycznych wniosków ilościowych. Rozprawa zyskuje tam, gdzie Autor konsekwentnie rozróżnia pojęcia dekoloryzacji, usunięcia, degradacji i mineralizacji, jednak nie wszędzie utrzymuje tę samą dyscyplinę językową.

W mojej ocenie rozprawa wnosi istotny i oryginalny wkład w czterech obszarach.

Po pierwsze, praca jako pierwsza w literaturze dostarcza pełnej, popartej analizą HPLC i GC-MS dokumentacji biodegradacji (a nie tylko dekoloryzacji) barwnika azowego Evans Blue przez czystą kulturę *S. oneidensis* MR-1. Stanowi to przełom interpretacyjny i metodyczny na tle dotychczasowych prac, które powszechnie stosowały wyłącznie UV-Vis.

Po drugie, wdrożenie systemu DCMFC z tlenową fazą doczyszczającą z mieszanymi szczepami promieniowców wyizolowanych z kompostu ogrodowego jest podejściem nowatorskim. Po raz pierwszy wykazano, że mieszana kultura promieniowców może pełnić tę rolę w układzie DCMFC.

Po trzecie, wykazanie, że modyfikacja bioanody warstwą PANI-glukoza-żelatyna (MCC) prowadzi do 50-krotnego wzrostu CSC, poprawy adhezji i żywotności biofilmu oraz umożliwia degradację Evans Blue przy stężeniach dotychczas uznawanych za inhibitujące (do 450 mg/dm³), jest znaczącym osiągnięciem inżynierskim z perspektywą skalowania.

Po czwarte, metodologiczna i interpretacyjna systematyzacja różnych dróg zaniku barwy (biosorpcja vs. biodegradacja) w układach z immobilizowaną biomasą, poparta dowodami desorpcji barwnika, stanowi cenny wkład metodyczny mający szersze zastosowanie w inżynierii środowiskowej.

Nowość pracy ma charakter przede wszystkim integracyjny: połączenie selekcji mikroorganizmów, weryfikacji chemicznej, optymalizacji statystycznej i bioelektrochemicznej inżynierii biointerfejsu w jednym spójnym programie jest rzadko spotykane w pracach doktorskich w tej dziedzinie.

Uwagi krytyczne i rekomendacje

Poniższe uwagi traktuję jako uwagi rozwojowe, a nie uchybienia podważające wartość pracy:

1. Brak pełnego bilansu masowego i pełnej identyfikacji polarnych, sulfonowanych produktów pośrednich w części dotyczącej SCMFC. GC-MS nie wychwytuje frakcji silnie polarnej. Należałoby rozszerzyć analitikę o LC-MS/MS, bilans TOC/ChZT dla wszystkich głównych etapów oraz przynajmniej jeden zestandaryzowany test toksyczności przed i po oczyszczaniu.
2. Brak walidacji długookresowej stabilności warstwy MCC podczas pracy ciągłej i przy obciążeniach hydraulicznych bliższych rzeczywistym. Rekomendowane byłoby przeprowadzenie testów ciągłych, dokonanie oceny foulingu, starzenia i odporności na zmiany zasolenia i pH.
3. Badania wykonano na roztworach modelowych, nie na rzeczywistych ściekach tekstylnych. Wartościowe byłoby przeprowadzenie testów z wykorzystaniem ścieków rzeczywistych zawierających sole, surfaktanty i mieszaniny barwników.
4. Rozdzielenie udziału poszczególnych grup funkcjonalnych w układach mieszanych (DCMFC) było niewystarczające. Należałoby powiązać dane 16S rRNA z analizą funkcjonalną lub bilansem elektronowym.
5. Brak formalnej analizy techno-ekonomicznej (CAPEX/OPEX, koszty jednostkowe oczyszczania). Rekomendowane byłoby oszacowanie kosztów materiałowych, HRT i skalowania przed przejściem do fazy pilotażowej.

Po zapoznaniu się z treścią rozprawy nasuwają się następujące pytania, na które Doktorant powinien odpowiedzieć podczas obrony pracy:

1. Czy nie zachodzi obawa, że produkty transformacji Evans Blue identyfikowane przez GC-MS w etapie SCMFC (kwasy 3-metylobutanowy i oktanowy) są produktami wtórnego metabolizmu składników pożywki (np. octanu), a nie bezpośrednimi metabolitami degradacji Evans Blue? Jak autor weryfikuje ich pochodzenie?

2. Analiza 16S rRNA w etapie DCMFC ujawniła istotny udział *Thermochromatium* (4.82%) w konsorcjum anodowym. Jak autor interpretuje obecność tej fotosyntetyzującej bakterii siarczanowej w warunkach anaerobowych bez zewnętrznego źródła światła?
3. W jakim zakresie wyniki modułu I (wykorzystanie *Actinomyces*) mogą być sparametryzowane i wykorzystane do projektowania reaktorów? Jakie kluczowe parametry inżynierskie (obciążenie substratowe, retencja biomasy) autor uznałby za najistotniejsze w przypadku przenoszenia wyników na większą skalę?
4. Jakie są główne bariery w transferze technologii SCMFC-MCC do warunków rzeczywistych ścieków tekstylnych (złożona matryca, zmienne pH i zasolenie) i w jaki sposób modyfikacja bioanody mogłaby, lub nie, im sprostać?

Wiosck

Rozprawa doktorska mgr inż. Kamrana Ayaza pt. „Application of Pure and Mixed Cultures of Bacteria Strains in Synthetic Dyes Removal Processes – Mechanisms and Optimisation of Process Conditions” jest opracowaniem na bardzo wysokim poziomie naukowym, cechującym się przemyślaną logiką badawczą, szerokim i poprawnym warsztatem metodologicznym, oryginalnym wkładem eksperymentalnym oraz rzetelnością interpretacyjną. Łączy poprawność ilościową prezentacji danych z dojrzałą interpretacją mechanistyczną.

Praca spełnia wszystkie kryteria określone w art. 187 ust. 1 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce: stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktoranta w dyscyplinie naukowej oraz wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

W mojej ocenie praca ma także cechy wyróżniające: bardzo dobrą spójność programu badawczego i wyraźny potencjał rozwoju w kierunku badań pilotażowych. Zgłoszone uwagi i pytania nie pomniejszają pozytywnej oceny pracy, lecz wskazują na obszary warte dalszej pracy naukowej.

W związku z powyższym stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Kamrana Ayaza spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim zgodnie z obowiązującymi przepisami prawnymi i wnoszę o dopuszczenie Doktoranta do publicznej obrony. Równocześnie wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Podpisała Ewa Wiśniowska