

Streszczenie 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*

STRESZCZENIE

Barwniki syntetyczne są szeroko stosowane, zwłaszcza w przemyśle tekstylnym. Zapewniają one intensywny kolor, wiele odcieni oraz trwałość barwy wybarwionego materiału. Duża część barwników w trakcie aplikacji nie wiąże się z włóknami i pozostając w roztworze oraz ulegając wypłukaniu tworzy barwne ścieki. Największy problem dotyczy barwników dobrze rozpuszczalnych w wodzie i anionowych, które są projektowane tak, aby pozostawały stabilne w kąpielach barwierskich. Ich stabilność, ładunek i budowa sprawiają, że trudno usuwać je ze ścieków standardowymi metodami fizycznymi, chemicznymi lub biologicznymi. Barwniki azowe stanowią największą grupę, jeżeli chodzi o różnorodność jak i stosowane ilości, i często są trudne do usuwania w procesie oczyszczania ścieków. Rozpad wiązania azowego powoduje zanik barwy (dekoloryzację), który nie stanowi gwarancji pełnego rozkładu cząsteczki i może prowadzić do powstania aromatycznych, toksycznych produktów ubocznych, które mogą się utrzymywać w cieczy lub wymagać tlenowego utleniania w celu obniżenia toksyczności. Dlatego oczyszczanie musi wykraczać poza sam efekt dekoloryzacji, aby zapewnić rzeczywistą zmianę chemiczną, kontrolę powstających produktów ubocznych oraz działać w różnych układach mikroorganizmów i reaktorów celem całkowitego usunięcia związku i pochodnych.

W niniejszej rozprawie doktorskiej zaprezentowano wyniki badań usuwania wybranych barwników syntetycznych przez bakterie. Większość wyników dotyczy zastosowania błękitu Evansa (EB, Direct Blue 53) jako głównego barwnika testowego. EB jest silnie sulfonowanym barwnikiem diazowym, bardzo dobrze rozpuszczalnym w wodzie, intensywnie zabarwionym i reprezentatywnym dla trudnych do usunięcia anionowych barwników azowych. Praca realizuje plan etapowo: zaczyna się od kontrolowanych układów biologicznych, a następnie przechodzi do projektowanych układów bioelektrochemicznych. Każdy etap opiera się na dowodach mechanistycznych, a nie wyłącznie na śledzeniu zaniku barwy monitorowanego spektrofotometryczną metodą UV–Vis. Celem jest opracowanie i walidacja strategii biologicznych i bioelektrochemicznych, które przyspieszą usuwanie EB z użyciem czystych i mieszanych kultur

bakteryjnych, przy jednoczesnym potwierdzeniu rzeczywistej transformacji chemicznej. Badania określają także praktyczne ograniczenia oraz punkty, które mogą poprawić zarówno wydajność procesu, jak i kontrolę mechanistyczną.

Pierwszy rozdział eksperymentalny skupia się na screeningu ukierunkowanym na pozyskanie wybranych gatunków bakterii (*Actinomycetes*) biorących udział w procesach usuwania barwników syntetycznych. Screening promieniowców (*Actinomycetes*) prowadzono na podłożach stałych pod kątem dekoloryzacji barwników, disazowego EB, trifenylometanowej zieleni brylantowej (BG) i fioletu krystalicznego (CV). W tej części badań zastosowano również immobilizację biomasy na tanich, naturalnych nośnikach stałych w celu stabilizacji biomasy, zwiększenia retencji i skuteczności degradacji barwników oraz wsparcia zasadności późniejszego przeniesienia do układów reaktorowych.

Zastosowane nośniki to: wióry iglaste, słoma oraz zrębki liściaste. Jedynie na słomie uzyskano widoczny wzrost mikroorganizmów w testach wstępnych, dlatego wybrano ją także do eksperymentu głównego. Po 14 dniach sama słoma oraz sama biomasa wykazywały słabszą dekoloryzację lub degradację barwników, aniżeli połączenie słomy z biomasą, co dawało lepsze wyniki. Szczep 1K1 usunął 66,6% BG oraz 80% EB. Szczep EGK2 usunął 97,8% BG oraz 73% EB. Celem było też określenie głównych mechanizmów zaniku barwy. W układach z nośnikami barwa może zanikać z powodu: biosorpcji, rozkładu barwnika przez mikroorganizmy, lub sorpcji barwnika przez nośnik. Wyniki badań screeningowych pomogły wybrać szczepy do tlenowego doczyszczania w kolejnych rozdziałach eksperymentalnych. Pomimo lepszego usuwania barwnika w układach z immobilizowaną biomasą występowało kilka ograniczeń wymagających rozwiązania. Długi czas inkubacji oraz złożony, niejednoznaczny udział fizycznej sorpcji i procesów biologicznych były głównymi problemami. Wyniki te uzasadniają przejście do badań nad innymi organizmami modelowymi i bardziej ścisłej, kontrolowanej optymalizacji w kolejnych rozdziałach eksperymentalnych.

Drugi rozdział eksperymentalny skupia się na biodegradacji barwnika EB przez elektroaktywną bakterię modelową *Shewanella oneidensis* MR-1. Projekt wykorzystuje statystyczną metodę Response Surface Methodology (RSM) do optymalizacji kluczowych zmiennych: czasu, temperatury, początkowego stężenia barwnika oraz stężenia donora elektronów. Kinetykę UV-Vis zastosowano do śledzenia zaniku barwy. Transformację chemiczną weryfikowano metodą

chromatograficzną HPLC w celu śledzenia zaniku macierzystej formy barwnika oraz GC–MS w celu identyfikacji produktów jego transformacji.

Taka komplementarna analiza czynników umożliwia zdefiniowanie procesowego okna pracy zamiast analizy pojedynczego punktu/parametru operacyjnego. Wyjaśnia, w jaki sposób ładunek barwnika, temperatura oraz dopływ donora elektronów kontrolują zarówno szybkość, jak i kompletność biokonwersji Evans Blue (EB). W warunkach zoptymalizowanych uzyskano niemal całkowitą dekoloryzację (>99%). Zanik chromoforu, wraz z pojawieniem się produktów aromatycznych i krótkołańcuchowych kwasów, potwierdził rzeczywistą degradację barwnika, a nie biosorpcję. Wyniki te pokazują, że czysta kultura *Shewanella oneidensis* MR-1 jest skutecznym biokatalizatorem w usuwaniu EB oraz że metodologia Response Surface Methodology (RSM) pozwala zdefiniować praktyczne okno pracy dla przyszłych zastosowań. Zastosowany układ skrócił również czas pełnej dekoloryzacji z 14 dni (Rozdział 1) do 3 dni. Ponadto czysta hodowla *S. oneidensis* MR-1 całkowicie zmineralizowała EB, gdy warunki procesu i wzrostu były w pełni zoptymalizowane.

Trzeci rozdział eksperymentalny prezentuje wyniki skutecznej dekoloryzacji, degradacji i całkowitej mineralizacji barwnika diazowego Evans Blue, z użyciem mieszanej kultury bakteryjnej oraz zintegrowanego systemu łączącego dwukomorowe mikrobiologiczne ogniwo paliwowe (DCMFC) z tlenowym bioreaktorem. Ta część badań dotyczy roztworów zawierających wysokie stężenia toksycznych barwników, z dwoma wytyczonymi celami: osiągnięciem wysokiej skuteczności dekoloryzacji oraz charakterystyki społeczności mikroorganizmów. Inokulum na bazie beztlenowego osadu czynnego, pobranego z oczyszczalni ścieków, wykorzystano w procesie usuwania Evans Blue na anodzie DCMFC przy początkowych stężeniach barwnika 100 i 200 mg/L. W MFC anoda tworzy środowisko o niskim potencjale redoks, które sprzyja redukcyjnemu rozszczepieniu wiązań azowych, jednocześnie umożliwiając odzysk energii w postaci prądu elektrycznego. W etapie tlenowego doczyszczania wykorzystano dwa mieszane szczepy promieniowców wyizolowane z kompostu ogrodowego. Ta mieszana kultura bakterii utleniała zredukowane intermedanty oraz resztkową materię organiczną wytworzoną na anodzie, wspierając pełną mineralizację barwnika.

Dokonano oceny skuteczności dekoloryzacji, składu społeczności mikroorganizmów za pomocą sekwencjonowania 16S rRNA, a spektroskopię impedancyjną (EIS) zastosowano do oceny oporu

anody i DCMFC. Wyniki wykazały skuteczność dekoloryzacji w zakresie $90 \pm 2\%$ do $98 \pm 1,9\%$ dla stężenia EB 100 mg/L oraz $79 \pm 2\%$ do $87\% \pm 1\%$ dla 200 mg/L, po 20-24 h procesu. Analiza społeczności mikrobiologicznej ujawniła istotną obecność *Pseudomonadota* (45,5% w hodowlach zaadaptowanych do barwnika i 32% w hodowlach inokulum), z kluczowymi rodzajami obejmującymi *Actinomarinicola* (13,75%), *Thermochromatium* (4,82%) oraz *Geobacter* (4,52%). Badania te podkreślają potencjał zintegrowanego systemu DCMFC–tlenowego, wykorzystującego po raz pierwszy w etapie tlenowym mieszane szczepy promieniowców, co w przyszłości może być zastosowane z korzyścią dla skutecznego oczyszczania przemysłowych ścieków barwnikowych, oferując korzyści środowiskowe i bioenergetyczne. Rozdział ten prezentuje rozwiązania, które skróciły czas dekoloryzacji z 3 dni do 20–24 godzin, osiągając pełną mineralizację poprzez dodanie wtórnego etapu tlenowego. Oczyszczono także wyższy ładunek początkowy Evans Blue wynoszący 200 mg/L, dwukrotnie większy niż w rozdziałach 1 i 2. Pozostały trzy ograniczenia: długi okres rozruchu (adaptacji) około 30 dni zanim można rozpocząć właściwy eksperyment degradacji EB przy początkowym stężeniu 100 i 200 mg/L, dodatkowe zapotrzebowanie energetyczne wynikające z etapu tlenowego oraz trudne śledzenie mechanizmu w układzie z mieszaną mikrosoczołnością. Problemy te wskazują na potrzebę optymalizacji reaktora i biointerfejsu MFC i podjęcia próby zastosowania przyjaznego dla środowiska, jednokomorowego mikrobiologicznego ogniwa paliwowego (SCMFC), aby czysta hodowla mogła dorównać lub przewyższyć tę wydajność, zapewniając jednocześnie bardziej interpretowalne mechanizmy i łatwiejszą kontrolę procesu.

Na podstawie ograniczeń poprzedniego rozdziału, zdecydowano się na kierunek badań, którego wyniki zaprezentowano w ostatnim rozdziale eksperymentalnym. Zawarto tu wyniki: wpływu modyfikacji tkaniny węglowej (elektrody anodowej) z użyciem polianiliny (PANI), glukozy i żelatyny na możliwość tworzenia biofilmu; transferu ładunku oraz żywotności mikroorganizmów z wykorzystaniem czystej hodowli *Shewanella oneidensis* MR-1. Czyste hodowle są bardziej podatne na toksyczny wpływ barwników i wykazują gorszą wydajność przy wysokich początkowych stężeniach barwnika. Wyniki cyklicznej woltamperometrii oraz badania żywotności biofilmu dla zastosowanych modyfikacji elektrod wykazały, że tkanina węglowa pracująca w roztworze glukozy (CC.G.B) sprzyja głównie wzrostowi planktonicznemu, ograniczając adhezję bakterii, natomiast zmodyfikowana tkanina węglowa (MCC.B) sprzyja najlepszemu rozwojowi biofilmu ($90,2 \pm 0,2\%$) oraz pojemności magazynowania ładunku ($174,9 \pm 10,2$ mC/cm²), co

odpowiada około 50-krotnemu wzrostowi CSC w porównaniu z układem z niezmodyfikowaną tkaniną węglową (CC.B) ($3,3 \pm 0,3$ mC/cm²), podkreślając synergiczny wpływ modyfikacji powierzchni i aktywności mikroorganizmów. Wyniki te pokazują, że MCC.B ułatwia pozakomórkowy transfer elektronów poprzez optymalizację adhezji bakterii i dostępności składników odżywczych, co czyni go obiecującym kandydatem do skrócenia rozruchu układu do 3 dni (30 dni w rozdziale 3) oraz poprawy wczesnej wydajności bioelektrody.

W SCMFC ze zmodyfikowanym interfejsem anody osiągnięto w 13 godzinie procesu około 96–97% dekoloryzacji przy stężeniu EB 150 mg/L ($t_{50} \approx 5$ h; $t_{80} \approx 9$ –10 h), 90–91% przy 300 mg/L oraz 73% przy 450 mg/L. Tym samym obniżono czas dekoloryzacji do 13 godzin z 24 godzin (rozdział 3). Układ działał także stabilnie przy początkowym ładunku 450 mg/L, podczas gdy wcześniejsze eksperymenty wykazywały ograniczenia wydajności z powodu toksyczności barwnika powyżej 200 mg/L. Analiza GC–MS wykazała, że EB jest degradowany do mniej toksycznych związków, głównie niskocząsteczkowych kwasów 3-metylbutanowego i oktanowego, nawet bez tlenowego etapu doczyszczania. Wyniki te wskazują na kontrolowalną sekwencję: zmodyfikowana chemia powierzchni elektrody anodowej poprawiła przyczepność czystej kultury bakterii i pozwoliła na zniesienie toksycznego wpływu wysokiego początkowego stężenia barwnika dzięki dobrze rozwiniętemu biofilmowi na zmodyfikowanej elektrodzie. Wzmocniło to również transfer elektronów oraz zwiększyło szybkość i zdolność procesu. Rozwiązanie pozostaje proste, wykorzystuje standardową tkaninę węglową i jest skalowalne do szybszego oczyszczania.