

Poznań, 4 grudnia 2015



## **POLITECHNIKA POZNAŃSKA**

Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska  
INSTYTUT INŻYNIERII ŚRODOWISKA  
ul. Berdychowo 4, 60-965 POZNAŃ

Dr hab. inż. Piotr Oleśkowicz-Popiel  
Tel. (61) 665-34-98  
Fax. (61) 665-24-44  
e-mail: [piotr.oleskowicz-popiel@put.poznan.pl](mailto:piotr.oleskowicz-popiel@put.poznan.pl)

### **RECENZJA**

**rozprawy doktorskiej mgr Romana ZAGRODNIKA**

**pt.: „Immobilizowane kultury bakteryjne do produkcji wodoru w fermentacyjnych procesach ciągłych”**

Recenzja została sporządzona na zlecenie Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w zawiązku z uchwałą z dnia 20 listopada 2015 roku, przekazaną w piśmie Dziekana Wydziału Chemii UAM prof. zw. Dr hab. Henryka Koroniaka – (pismo nr L. dz. MIC/352/15).

#### **1. Ogólna charakterystyka pracy**

Praca liczy 239 stron i składa się z 7 rozdziałów części teoretycznej, 7 rozdziałów części doświadczalnej, wniosków, spisu literatury, streszczenia w języku angielskim oraz wykazu dorobku naukowego. Spis literatury obejmuje 343 pozycje i jest przeglądem najnowszej międzynarodowej literatury (lata 2005-2015) związanej z tematyką rozprawy. Przeważają prace opublikowane w czołowym czasopiśmie związanym z tematyką produkcji wodoru, tj., International Journal of Hydrogen Energy. Wiele pozycji pochodzi z renomowanego czasopisma międzynarodowego Bioresource Technology, pozostałe to m. in. Biotechnology for Biofuels, Biomass and Bioenergy, Applied Energy, Journal of Biotechnology, Renewable and Sustainable Energy Reviews, Biotechnology Progress, a także Energy and Environmental Science czy Nature.

Uważam, że przegląd literatury jest na tyle wartościowy, iż powinien zostać przetłumaczony na język angielski i opublikowany w jednym z renomowanych międzynarodowych czasopism przeglądowych, np. Renewable and Sustainable Energy Reviews lub Reviews in Environmental Science and Bio/Technology.

**Oceniana praca ma charakter doświadczalny i mieści się w dziedzinie nauk chemicznych.**

## **2. Ocena tematyki pracy**

Rozprawa doktorska dotyczy immobilizacji kultur bakteryjnych do produkcji wodoru i opracowania strategii produkcji wodoru w procesach ciągłych. Wodór jest obiecującym paliwem przyszłości z bardzo wysoką ilością energii w przeliczeniu na jednostkę masy. Ponadto, przy wykorzystaniu go w ogniwach paliwowych jedynym produktem spalania wodoru jest woda, więc korzyści z produkcji wodoru ze źródeł odnawialnych (biomasy, strumieni odpadowych) wydają się być niezaprzeczalne. Z drugiej jednak strony wydajność procesów fermentacyjnych produkcji wodoru wciąż jest niska i po mimo badań prowadzonych od wielu lat przez szereg ośrodków badawczych, nadal nie udało się w pełni skomercjalizować biotechnologicznej produkcji wodoru i wykorzystać go jako biopaliwa.

Doktorant w swojej pracy podejmuje następujące wyzwania: optymalizację fermentacji ciemnej i fotofermentacji a następnie połączenie ich w układzie hybrydowym. Koncepcja ta może być doskonałym rozwiązaniem w celu utylizacji odpadów i produkcji cennego biopaliwa. Poprzez fermentację ciemną można przekształcić mieszaninę związków organicznych do wybranych lotnych kwasów tłuszczowych (LKT) a w procesie fotofermentacji efektywnie wyprodukować wodór z LKT. Trudnością jest znalezienie optymalnych warunków, które odpowiadałyby obu procesom i pozwoliły by na symultaniczne prowadzenie obu rodzajów fermentacji z wysoką efektywnością. Oceniana rozprawa poświęcona jest opracowaniu najlepszego rozwiązania pozwalającego na znalezienie optymalnych warunków.

**Biorąc powyższe pod uwagę należy stwierdzić, że tematyka pracy doktorskiej mgr Romana Zagrodnika jest ważna i aktualna.**

## **3. Ogólna ocena treści pracy**

W omawianej rozprawie Autor postawił sobie za cel zbadanie wpływu różnych parametrów operacyjnych (HRT, pH, skład substratu), parametrów konstrukcyjnych (system okresowy, półciągły i ciągły) oraz sposobu immobilizacji bakterii (płytki szklane, perełki szklane

porowate i nieporowate) na przebieg badanych procesów fermentacji w celu zwiększenia szybkości i wydajności produkcji wodoru. Celem ostatecznym jest stworzenie systemu hybrydowego łączącego fermentację ciemną i fotofermentację.

Rozdział 1. zawiera ogólny wstęp do pracy i przedstawia racjonalnie zaplanowanych badań .

Rozdział 2. jest kontynuacją wstępu/wprowadzenia i omawia wodór jako nowoczesne biopaliwo i nośnik energii. Autor opisuje główne metody otrzymywania wodoru: konwencjonalne, termochemiczne i biologiczne. Autor wyjaśnia również główne parametry do oceny wydajności produkcji wodoru, w tym.: hydrogen production rate (HPR), substrate consumption rate (SCR) oraz substrate removal efficiency (SRE).

Rozdział 3. jest szczegółowym opisem obecnego stanu wiedzy dotyczącego ciemnej fermentacji na podstawie najnowszej literatury międzynarodowej.

Rozdział 4. jest szczegółowym opisem obecnego stanu wiedzy dotyczącego fotofermentacji na podstawie najnowszej literatury międzynarodowej.

Rozdział 5. omawia podstawy immobilizacji i podstawowe metody unieruchamiania mikroorganizmów. W dalszej części rozdziału autor skupia się na metodach immobilizacji stosowanych przy produkcji wodoru oraz opisuje systemy ciągłe fermentacji ciemnej i fotofermentacji.

Rozdział 6. jest opisem typów bioreaktorów stosowanych do produkcji wodoru.

Rozdział 7. omawia wybrane systemy zintegrowanej produkcji bioenergii ze szczególnym naciskiem na systemy do produkcji wodoru. Rozdział ten jest zgrabnym przejściem z części teoretycznej do części doświadczalnej.

**Rozdziały 2-7 są bardzo interesującym i wartościowym przeglądem literatury ściśle związanym z tematyką prac doświadczalnych. Przegląd ten oparty jest na 279 źródłach najnowszej literatury międzynarodowej.**

W rozdziale 8. Sformułowane zostały tezy, cel i zakres pracy. Cele pracy można streścić następująco:

- przeprowadzanie prób fermentacyjnych w trybie półciągłym i ciągłym w skonstruowanym fotobioreaktorze płaskopłytkowym z wykorzystaniem bakterii zimmobilizowanych,
- optymalizacja parametrów procesów fermentacji w trybie okresowym w celu znalezienia optimum i osiągnięcia wysokich wydajności procesu w trybie ciągłym,

- opracowanie strategii kontroli pH w układzie hybrydowym pozwalającym na przeprowadzenie jednoetapowego procesu produkcji wodoru łączącego fermentację ciemną i fotofermentację,
- zastosowanie skrobi jako substratu w układzie hybrydowym.

**Cel i zakres pracy zostały określone jasno i precyzyjnie. Osiągnięcie zaplanowanych celów oraz wykazanie prawdziwości zawartych w nich tez należy uznać za właściwe zadanie dla pracy doktorskiej.**

W rozdziale 9. Autor szczegółowo opisał metodykę badań. Przedstawił zastosowane pożywki, opisał metody aktywacji mikroorganizmów, budowę fotobioreaktora, metodę immobilizacji oraz opisał schemat systemu do prowadzenia fermentacji z kontrolą pH. W rozdziale tym Autor opisał również stosowane w badaniach metody analityczne.

**Opisana metodyka jest zgodna z międzynarodowymi standardami i pozwala na przeprowadzenie zaplanowanych badań oraz otrzymania wiarygodnych wyników i porównania ich z wynikami innych grup badawczych.**

Rozdział 10. przedstawia wyniki dotyczące przeprowadzonych półciągłych i ciągłych fotofermentacji w fotobioreaktorze płaskopłytkowym. Autor opisuje wyniki dziewięciu eksperymentów w których badano wpływ nośników mikroorganizmów i hydraulicznego czasu zatrzymania (HRT). Efekty przedstawiono jako zmiany ilości substratu i metabolitów, skumulowaną ilość wodoru oraz ilość biomasy w odcieku. W podsumowaniu Autor porównał wyniki procesu półciągłego i ciągłego. Głównymi parametrami porównawczymi były całkowita ilość wodoru oraz wydajność produkcji H<sub>2</sub>.

Rozdział 11. opisuje wyniki eksperymentów mających na celu optymalizację fermentacji ciemnej i fotofermentacji. Autor przedstawił wyniki optymalizacji fermentacji ciemnej oraz wpływ temperatury oraz pH na produkcję metabolitów. Optymalizacja fotofermentacji natomiast polegała na badaniu wpływu rodzaju i stężeniu źródła węgla i azotu, fosforanów, oraz temperatury i pH. Autor zbadał również wpływ intensywności światła oraz złożonych źródeł węgla na produkcję wodoru w procesach hybrydowych.

W rozdziale 12. przedstawiono wyniki badań z przeprowadzonych jednoetapowych systemach hybrydowych. Zbadano wpływ źródła węgla (glukoza i skrobia) oraz metodę dostosowania pH (początkowe bez kontroli i stałe z kontrolą).

W rozdziale 13. Autor opisał wyniki z trzynastu eksperymentów procesu hybrydowego z zastosowaniem immobilizacji. Zbadane zostały różne konfiguracje procesu w dwóch objętościach bioreaktora bez i z kontrolą pH, a także z wcześniejszą aktywacją bakterii na pożywce skrobi.

Rozdział 14. zawiera wnioski końcowe pracy w których potwierdzono zaplanowane cele.

Rozdział 15. to spis literatury

Rozdział 16. jest streszczeniem pracy w języku angielskim.

Rozdział 17. jest spisem dorobku naukowego Kandydata.

**Zbadanie parametrów wpływających na przebieg ciemnej fermentacji i fotofermentacji, skonstruowanie systemu produkcji wodoru w reaktorze płaskopłytkowym oraz przeprowadzenie jednoetapowych procesów hybrydowych z kontrolą pH, dogłębna analiza wyników i ich dyskusja w odniesieniu do literatury międzynarodowej oraz sformułowane wnioski świadczą o bardzo wysokiej wartości merytorycznej pracy. Opublikowanie większości wyników w prestiżowych czasopismach o zasięgu międzynarodowym (Bioresource Technology, International Journal of Hydrogen Energy) świadczy o bardzo wysokiej wartości naukowej pracy. Dorobek publikacyjny Kandydata jest ponadprzeciętny na tym etapie kariery naukowej.**

#### **4. Uwagi merytoryczne**

Praca bardzo dobrze przygotowana edytorsko ze znikomą ilością drobnych i mało znaczących usterek edytorskich. Poniżej uwagi merytoryczne do pracy:

- strona 15, wiersz 25: Autor podaje plany narodowego programu wodorowego USA do roku 2025, ale korzysta ze źródła z 1999 r. Uważam, że aktualniejsze źródło powinno zostać wykorzystane.
- Strona 17, wiersz 8: Autor powinien korzystać ze źródeł pierwotnych, tj. z aktualnych planów Departamentu Energii USA przy podawaniu założeń gospodarki energetycznej USA. Plany te są aktualizowane i dopasowywane do bieżących zapotrzebowani na energię oraz stopnia rozwoju technologii.
- Strona 20, wiersz 12-14: duże wykorzystanie biomasy w krajach rozwijających z reguły związane jest tylko zapotrzebowaniem na opał dla kuchni. Powinno się rozdzielać pomiędzy tradycyjnym wykorzystaniem biomasy w krajach rozwijających się (opał do kuchni) a zaawansowanymi technologiami do wytwarzania nośników energii np. biogazu, biowodoru.
- Strona 37, wiersz 15-17: nie jest jasne czy podana wartość  $1,60 \text{ mol H}_2/\text{mol}_{\text{glukozy}}$  odnosi się tylko do suplementowanej glukozy, czy autorzy tej publikacji przeliczyli zawartość

związków organicznych w gnojówce świńskiej na ekwiwalent glukozy. Autor powinien szczegółowiej opisać zacytowany wynik prac.

- Strona 40, wiersz 3-8: Kandydat słusznie komentuje, że rozbieżność wyników co do optymalnej wartości pH na końcowe produkty fermentacyjne zależy od zastosowanego substratu i inokulum. Autor mógłby nieco rozszerzyć ten paragraf podając jakie substraty były wykorzystane w przytoczonych pracach. Najnowsze wyniki badań wskazują, że dla tzw. niezidentyfikowanych kultur mieszanych największy wpływ na przebieg procesu i skład mikrobiologiczny ma rodzaj substratu.
- Strona 51, wiersz 21: pomyłka w numeracji odnośnika do rozdziału.
- Strona 68, wiersz 17: powinno być HRT zamiast pH.
- Strona 73, wiersz 24-30: Autor podaje metody kontroli temperatury w fotobioreaktorach. W ostatnim zdaniu podaje „można też stosować termotolerancyjne szczepy bakterii”. Tę informację można by rozszerzyć. Do jakich temperatur można dostosować szczepy produkujące wodór? W takim przypadku, również należy utrzymać stałą temperaturę procesu. Czy chłodzenie tylko w przypadku przegrzania pozwoli utrzymać stabilną temperaturę a przez to stabilny proces? Wartościową informacją było by podanie przykładów rozwiązań dla fotobioreaktorów w skali technicznej.
- Strona 80, wiersz 12-13: w ostatnich latach nastąpił wzrost zainteresowania produkcją polihydroksyalkanolanów lub średnio-łańcuchowych kwasów tłuszczowych np. Kleerebezem et al. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 2015, DOI 10.1007/s11157-015-9374-6.
- Strona 89: oprócz celów pracy mogłyby również zostać przedstawione hipotezy badawcze. Tego zabrakło w Rozdziale 8. Z opisu pod każdym celem, czytelnik może się domyśleć jakie hipotezy zostały postawione, jednakże ich opisanie byłoby pomocne.
- Strona 89, wiersz 3-4: zdanie „wodór jest najlepiej prognozującym nośnikiem energii odnawialnej” jest bardzo ogólne i subiektywne. Należy być bardzo ostrożnym ze stawianiem takich tez bez poparcia literaturowego.
- Strona 99, wiersz 26-33: to bardzo dobry układ do przeprowadzania badań, ograniczający ilość czynników wpływających na przebieg procesu, ale czy taki układ będzie można w jakikolwiek sposób przenieść do skali technicznej zachowując zbliżone wydajności przebiegu procesu?
- Strona 103, wiersz 18: dlaczego wybrano takie wartości pH? Czy są to optymalne wartości dla wykorzystywanych szczepów bakterii?

- Strona 104, wiersz 12: skąd wybór temperatury 32°C, czy jest to optymalna temperatura dla wykorzystywanych szczepów bakterii?
- Strona 106, wiersz 14-15: dlaczego zdecydowano się na stężenie kwasu masłowego 1 g/L i octowego 0,5 g/L?
- Strona 107, wiersz 12: krótkie uzasadnienie dla wyboru zakresu pH byłoby przydatne.
- Strona 108, wiersz 18: stężenie kwasów masłowego i octowego są stosunkowo duże, czy nie będą inhibitować procesu?
- Strona 114, rys. 24: dlaczego zatrzymano proces w eksperymentach I-III? Mimo, iż procesy spowalniały, przedłużenie ich do 70h pozwoliłoby na dokładne porównanie z eksperymentem IV. Warto zwrócić uwagę, że po 50h godzinach procesu produkcja wodoru w eksperymencie IV nie jest wiele wyższa niż w eksperymencie II.
- Strona 116, rys. 25: komentarz j.w.
- Strona 118, wiersz 15-20: Czy zaobserwowano również tworzenie się biofilmu na ścianach fotobioreaktora?
- Strona 119, rys. 26: w eksperymencie I zauważyć można wzrost stężenia kwasu jabłkowego w ciągu pierwszych 10 dni procesu. Jak można by to wytłumaczyć?
- Strona 121, wiersz 11-19: to bardzo ciekawe spostrzeżenia, które można by wykorzystać przy próbie zwiększenia skali procesu i przeprowadzania go w warunkach naturalnych dzień/noc.
- Strona 125, wiersz 7-11: porowatość ma znaczący wpływ na wydajność procesu, to cenna informacja przy próbie zwiększania skali procesu.
- Strona 126, wiersz 16-18: Autor napisał „należy znaleźć kompromis pomiędzy wysoką szybkością produkcji wodoru, a wysokim przereagowaniem substratu”. Z pomocą mogłaby tu przyjść analiza techniczno-ekonomiczna dzięki której można by określić, który wariant byłby najkorzystniejszy.
- Strona 131, wiersz 11-16: Autor słusznie zauważył, że w określonych *C. acetobaculum* jest w stanie prowadzić fermentację ABE (acetono-butanolo-etanolową). Jest to też ciekawe wykorzystanie tych mikroorganizmów, które zostało opisane np. w Anbaransan et al. Nature 2012, doi:10.1038/nature11594.
- Strona 152, wiersz 10-13: Autor stwierdza „pH jest kluczowym parametrem dla tych procesów i wymaga dalszej optymalizacji”. Ten wniosek jest zbyt ogólny, należałoby go nie co bardziej rozwinąć.

- Strona 153, wiersz 17-20: Autor wywnioskował, że „związki oparte o materiały celulozowe nie były więc dobrymi substratami dla rozwoju tych bakterii”. *C. acetobutylicum* nie mają możliwości wytwarzania enzymów celulazy, więc można się było spodziewać, że celuloza nie będzie mogła być wykorzystana jako bezpośrednie źródło węgla.
- Strona 171, wiersz 19-23: mimo, że lag faza dla skrobi trwała stosunkowo długo (56 h), to nie będzie ona miała znaczenia w przypadku procesów ciągłych, gdyż bakterie zdążą się zaadaptować do tego substratu.
- Strona 183, wiersz 11: akumulacja substancji zapasowych w postaci PHB jest niezwykle ciekawa. Obecnie na świecie powstają już instalacje w skali pół-technicznej do produkcji tych związków.
- Strona 192, wiersz 31-34: Autor stwierdził „dla stworzenia jednoetapowych systemów hybrydowych powinno poszukiwać się szczepów bakterii prowadzących ciemną fermentację przy pH powyżej 7, tak aby zwiększyć wydajność całego procesu”. Nasuwa się pytanie, dlaczego Kandydat zdecydował się na prowadzenie badań nad fermentacją ciemną z dwoma szczepami tj. *C. beijerinckii* i *C. acetobutylicum*, a nie wykorzystać tzw. niezdefiniowaną mieszaną kulturę, w której znalazłyby się bakterie, które mogły by prowadzić proces przy pH powyżej 7. Dodatkowym atutem byłaby zdolność konsorcjum bakteryjnego do wykorzystania celulozy (przynajmniej w większym stopniu niż czysta kultura *C. acetobutylicum*).
- Strona 195, wiersz 4-6: Autor zauważył, że zwiększenie objętości bioreaktora z 135 mL do 305 mL znacznie zmniejszyła się szybkość produkcji H<sub>2</sub> tj. z 18,1 do 11,6 mL H<sub>2</sub>/L/h. Nie jest to dobra wiadomość dla przeniesienia procesu do skali pilotowej i pół-technicznej.
- Strona 209, wiersz 1-2: niestabilne pH wynikało ze słabego mieszania w bioreaktorze. Zastosowanie mieszadełka magnetycznego w bioreaktorze wypełnionym nośnikiem nie mogło być zadowalającym rozwiązaniem. Budowa reaktora typu upflow, prawdopodobnie przyniosłaby lepsze wyniki.

**Powyższe uwagi i komentarze w znacznej części mają charakter dyskusyjny i nie podważają najważniejszych osiągnięć pracy.**



## 5. Podsumowanie

Praca jest napisana bardzo poprawnym językiem a stosowana terminologia nie budzi zastrzeżeń. Autor pracy prezentuje doskonałą znajomość tematu i bieżącej literatury międzynarodowej. Autor dobrze formułuje problemy badawcze, rzetelnie opisuje otrzymane wyniki i przeprowadza ciekawą dyskusję w oparciu o najnowszą literaturę międzynarodową. Również wnioski wynikające z uzyskanych wyników są sformułowane poprawnie. Poszczególne eksperymenty bazują na otrzymanych wynikach i łatwo można dostrzec logiczny ciąg w przeprowadzonych badaniach. Według mojej oceny jest to rozprawa doktorska ponadprzeciętna.

### **Za oryginalny dorobek naukowy Kandydata należy uznać:**

- zaprojektowanie i skonstruowanie fotobioreaktora płaskopłytkowego,
- opracowanie metody zwiększenia objętości roboczej bioreaktora poprzez zastosowanie perełek porowatych,
- zoptymalizowanie procesów ciągłych i uzyskanie prawie dwukrotnie wyższej ilości wodoru w porównaniu z procesami półciągłymi,
- opracowanie optymalnych parametrów dających możliwość jednoczesnego przeprowadzania fermentacji ciemnej i fotofermentacji,
- określenie optymalnych warunków pH dla fermentacji ciemnej i fotofermentacji i zastosowanie aktywnej kontroli pH dla układu hybrydowego.

## 6. Wniosek końcowy

Reasumując, uważam, że przedstawiona **praca doktorska mgr Romana Zagrodnika spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim** określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami).

**Dodatkowo, wnoszę wniosek o wyróżnienie tej rozprawy** argumentując to wysoką jakością przeprowadzonych badań i ich dużym znaczeniu w poszerzeniu wiedzy dotyczącej produkcji wodoru. Świadczą o tym opublikowanie przez Kandydata wyniki pracy w prestiżowych czasopismach o zasięgu międzynarodowym (2 publikacje w Bioresource Technology i 2 publikacje w International Journal of Hydrogen Energy).

**Stawiam wniosek o dopuszczenie rozprawy doktorskiej do publicznej obrony.**

