

Poznań, 24.11.2014.

Dr hab. inż. Paweł Cyplik
Katedra Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Sławomira Jabłońskiego pt: „Modelowanie procesu fermentacji metanowej z wykorzystaniem ADM1”

Wyczerpywanie się zasobów ropy naftowej i obawy związane z ocieplaniem klimatu wskutek nadmiernej emisji dwutlenku węgla, powodują gwałtowny wzrost zainteresowania paliwami ze źródeł odnawialnych w tym biogazem. Znaczna większość biogazowi rolniczych w Europie stosuje kiszonkę z kukurydzy i innych roślin jako podstawowy substrat do pozyskiwania biogazu. Tymczasem zwiększenie zapotrzebowania na kiszonkę spowodowało wzrost cen i negatywnie wpłynęło na opłacalność funkcjonowania biogazowi. W dodatku zwiększenie powierzchni upraw kukurydzy doprowadziło do powstania obszarów monokultury, co negatywnie wpływa na stan biocenoz. Stąd niezbędne są badania mające na celu wykorzystanie substratów alternatywnych do kiszzonek. Ze względu na wzrost cen żywności, spowodowany coraz silniejszą konkurencją z produktami roślinnymi przeznaczonymi na biopaliwa najlepszym rozwiązaniem byłoby znalezienie efektywnych energetycznie substratów nie będących w żadnym stopniu konkurencją do produkcji żywności. Funkcjonujące na zachodzie Europy systemy i rozwiązania technologiczne, zaszczerpione w polskich warunkach okazują się być za drogie lub za mało efektywne. Z tego względu tak ważnym jest, aby na polskim rynku zaistniały technologie odpowiadające lokalnym realiom.

Przedstawiona do oceny praca doktorska doskonale wpisuje się w te zagadnienia. Dotyczy modelowania procesu fermentacji metanowej z wykorzystaniem ADM1. Tematyka pracy jest niezwykle aktualna, gdyż Polska jako kraj rolniczy generuje dziesiątki milionów ton

odpadów organicznych i surowców lignocelulozowych rocznie, a potencjał ten jest w dużej mierze niewykorzystywany.

Rozprawa ma charakter doświadczalny i stanowi obszerne, jednolite opracowanie obejmujące 138 stron maszynopisu. Rozprawa posiada klasyczny układ rozdziałów, a mianowicie: wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski i literatura. Praca została zredagowana poprawnie i nie znalazłem w tekście i referencjach literaturowych istotnych usterek.

We wstępie (przeglądzie literaturowym) mgr Sławomir Jabłoński przedstawia aktualny stan wiedzy na temat procesu fermentacji metanowej. Część literaturowa napisana jest dobrym i precyzyjnym językiem. Autor cytuje 65 pozycji literatury światowej i krajowej, z których jednak tylko 16 to pozycje z ostatnich pięciu lat. Pozytywnie oceniam dobór materiałów źródłowych. Obejmuje on ważne prace z tej dziedziny i stanowi dobrą podstawę dla dokonania przeglądu literaturowego. Na początku Autor charakteryzuje rodzaje fermentacji i typy stosowanych reaktorów. Następnie opisane zostały biochemiczne przemiany materii organicznej oraz scharakteryzowano poszczególne grupy mikroorganizmów kluczowych dla procesu fermentacji metanowej. Zebrany materiał dostarcza dużą ilość szczegółowych informacji dotyczących bakterii i archeonów, ich warunków wzrostu oraz właściwości metabolicznych, a także metod badania ich obecności i aktywności metabolicznej w procesach fermentacji metanowej. Autor bardzo szczegółowo omawia przemiany materii organicznej i szlaki metaboliczne syntezy metanu.

Ciekawie napisany jest rozdział, w którym Autor przedstawia modelowanie procesu fermentacji metanowej. W podsumowaniu tego rozdziału Autor słusznie podkreśla, że w warunkach przemysłowych niezwykle istotne jest utrzymywanie dużej wydajności i stabilności produkcji biogazu. Z uwagi na wysoki stopień skomplikowania przemian zachodzących podczas fermentacji metanowej, kontrola wydajności nie jest zadaniem łatwym. Pomocne w przewidywaniu zachowań systemu fermentacyjnego może być modelowanie komputerowe. Autor zauważa, że poza tworzeniem prognoz zachowania systemu fermentacyjnego modele matematyczne buduje się w celu poznawczym, dla lepszego zrozumienia interakcji zachodzących między elementami systemu. W rozdziale tym Autor przedstawił procedurę postępowania przy modelowaniu badanego systemu i wyróżnił w niej następujące etapy: wybór odpowiedniego modelu teoretycznego, implementacja

modelu w postaci programu komputerowego, wstępny wybór zmiennych modelu, optymalizacja wybranych współczynników względem danych doświadczalnych oraz walidacja modelu. Następnie Autor opisał model ADM1, który jest jednym z najczęściej stosowanych modeli matematycznych wykorzystywanych w symulacjach odwzorowujących proces fermentacji metanowej oraz omówił jego modyfikacje. W ostatnim rozdziale przeglądu literaturowego mgr Sławomir Jabłoński opisał metody badawcze stosowane do wyznaczania wartości zmiennych dynamicznych opisujących stan metanogenezy, to jest: ilość i skład powstającego biogazu, oznaczenie składu substratu oraz parametrów branych pod uwagę podczas oceny stabilności procesu fermentacji metanowej takich jak: pH, stężenie lotnych kwasów tłuszczowych, stężenie jonów amonowych i amoniaku.

Podsumowując ocenę części teoretycznej rozprawy pragnę podkreślić, że doskonale wprowadza ona czytelnika w podstawowe problemy związane z częścią doświadczalną. Jest to materiał dobrze usystematyzowany, kompletny i dobrze napisany.

Jako podstawowe cele prac eksperymentalnych stawia Autor następujące zagadnienia: (1) Uruchomienie stanowiska badawczego pozwalającego na prowadzenie procesu fermentacji metanowej w skali laboratoryjnej w warunkach zbliżonych do instalacji przemysłowych, (2) Ocenę przydatności wybranych substratów jako potencjalnych surowców do produkcji biogazu, (3) Wyznaczenie parametrów charakteryzujących badane surowce pozwalających na symulowanie procesu fermentacji z wykorzystaniem modelu ADM1, (4) Określenie grup mikroorganizmów o kluczowym znaczeniu podczas procesu rozruchu i załamania procesu fermentacji, (5) Opracowanie prostej metody pomiarowej pozwalającej na wyznaczenie wartości zmiennych opisujących dane grupy mikroorganizmów na potrzeby modelowania procesu fermentacji z wykorzystaniem ADM1, (6) Określenie taksonomicznej przynależności badanych grup mikroorganizmów.

Przedstawiona do oceny rozprawa charakteryzuje się dobrze przygotowaną i opisaną metodyką badań. Odnosi się to zarówno do badań dotyczących wyznaczania specyficznej aktywności złoża i potencjału biodegradowalności beztlenowej jak i metod stosowanych do oznaczania lotnych kwasów tłuszczowych, stężenia jonów amonowych, oznaczania białka, lipidów, lignin, włókna oraz glicerolu. Szczegółowo opisane zostało stanowisko doświadczalne, a także metodyka badań związana z identyfikacją mikroorganizmów i modelowaniem wyników eksperymentalnych.

Ogólna ocena części doświadczalnej rozprawy doktorskiej Pana mgr Sławomira Jabłońskiego jest bardzo pozytywna. Praca obejmuje szeroki zakres wykonanych doświadczeń i zawiera dużą ilość materiału faktograficznego. Ponadto napisana jest w sposób precyzyjny i dobrze przemyślany.

W pierwszej części pracy Autor przedstawił wyniki badań dotyczące modelowania procesu fermentacji metanowej wybranych substratów takich jak: odchody bydlęce, odsiane odchody bydlęce, makuchy nasion roślin oleistych oraz Jatrofy przeczyszczającej, łuski nasion słonecznika, serwatkę w proszku oraz frakcję glicerynową powstałą w procesie transestryfikacji oleju rzepakowego. W próbkach oznaczono suchą substancję, popiół oraz ilość substancji lotnych. W celu wstępnego oszacowania biodegradowalności frakcji organicznej badanych substratów zbadana została w nich zawartość białek, lipidów oraz cukrów. Dodatkowo w materiale pochodzenia roślinnego określono zawartość lignin.

W kolejnym etapie pracy mgr Sławomir Jabłoński, przeprowadził testy biodegradowalności badanych substratów w trybie fermentacji okresowej, których celem była weryfikacja prognoz dotyczących produkcji biogazu opartych na analizach ich składu. Uzyskane wyniki pozwoliły na wyznaczenie stopnia rozkładu badanej biomasy.

W celu przeprowadzenia modelowania procesu fermentacji na podstawie danych dotyczących składu substratów obliczono współczynniki stechiometryczne oraz dane wejściowe dla modelu A_ZM₁. Do obliczenia tych wartości wykorzystano równania opublikowane przez Kocha i współpracowników, po ich częściowej modyfikacji polegającej na zastosowaniu współczynnika biodegradowalności w odniesieniu do wszystkich biopolimerów obecnych w substracie. Następnie w celu określenia kinetyki rozkładu wybranych substratów przeprowadzono testy fermentacyjne w trybie wsadowym. Optymalizowano stałe kinetyczne procesów dezintegracji oraz hydrolizy tak, aby wyniki podawane przez model odzwierciedlały przebieg rzeczywistego procesu. Wielkością porównywaną pomiędzy modelem a danymi eksperymentalnymi była sumaryczna produkcja biogazu. W celu potwierdzenia trafności oszacowania parametrów kinetycznych uzyskanych na podstawie doświadczeń w trybie wsadowym przeprowadzono fermentację ciągłą mieszaniny wyłoków rzepakowych oraz przesianych odchodów bydlęcych.

W kolejnym etapie przeprowadzono doświadczenia pozwalające na oszacowanie wielkości populacji bakterii syntroficznych utylizujących kwas propionowy oraz archeonów

acetoklastycznych. Następnie zweryfikowano poprawność działania modelu przez porównanie wyników symulacji z procesem rzeczywistym prowadzonym w bioreaktorze laboratoryjnym. W celu określenia przynależności taksonomicznej mikroorganizmów wchodzących w skład populacji osadu metanogenego przeprowadzono analizy mikroskopowe preparatów znakowanych sondami oligonukleotydowymi połączonymi ze znacznikiem fluorescencyjnym. Chciałbym podkreślić, że dobór warunków kontroli i specyficzności sond wskazują na dużą dbałość Autora o eliminację zakłóceń oraz fałszywie pozytywne i negatywne wyniki.

Silną stroną pracy jest dobra dyskusja wyników obejmująca interpretację przyczynowo skutkową oraz nawiązanie do danych literaturowych. Stwierdzam również, że wnioski wyciągnięte z przeprowadzonych badań znajdują pełne odzwierciedlenie w rezultatach przeprowadzonych doświadczeń.

Lektura kolejnych rozdziałów rozprawy doktorskiej mgr Sławomira Jabłońskiego obok bardzo pozytywnej oceny nasuwa pewne uwagi:

- Autor posługuje się pojęciami: biodegradowalność, współczynnik biodegradowalności i stopień biodegradowalności. Pojęcia te należałoby w pracy wyraźniej zdefiniować (str. 63),
- w pracy zabrakło charakterystyki substratów i przedstawienia kryteriów ich wyboru (miejsce pochodzenia lub wytwarzania, problem z zagospodarowaniem, ilość powstających odpadów w skali kraju, lokalizacja itp.),
- na jakiej podstawie wybrano współczynniki wyjściowe do modelu, co stanowiło kryterium wyboru (podobny substrat, warunki procesu?). Dlaczego jako odniesienie wybrano pracę Batstone i wsp. (2002) (str. 73),
- moim zdaniem w pracy dokonano estymacji parametrów modelu, a nie ich optymalizacji,
- na rysunkach (np. 4.1) przedstawiono między innymi wyniki symulacji bez optymalizacji. Przedstawiona symulacja bez optymalizacji nic nie wnosi do pracy. Moim zdaniem wyniki te należy usunąć z wykresów,

- zastosowanie resazuryiny w podłożu, która w formie zredukowanej wykazuje silną fluorescencję wydaje się w aspekcie badań z wykorzystaniem fluorescencji błędem metodycznym, zwłaszcza, że istnieje możliwość wnikania barwnika do komórek, co może prowadzić do zakłóceń szczególnie w eksperymencie mającym na celu oznaczenie (testowanie) specyficzności testowanych sond oligonukleotydowych,
- w jaki sposób ustalono stężenie formamidu w buforze hybrydyzacyjnym, w zależności od rodzaju sondy (str. 61, linia 14, tabela 3.5),
- czy przeprowadzono optymalizację temperatury hybrydyzacji, Autor podaje, że hybrydyzacja, niezależnie od rodzaju sondy, odbywała się w temperaturze 46 °C,
- praca zawiera błędy edytorskie:
 - w przekazanym do recenzji egzemplarzu zabrakło numeracji stron,
 - tytuły wielu rozdziałów zajmują ostatni wers na dole strony, powinny one zostać przeniesione na górę kolejnej strony, co poprawi estetykę pracy,
 - proponowałbym również zastosować ciągłą numerację rysunków i zrezygnować z numeracji powiązanej z rozdziałami, wydaje mi się, że taka numeracja jest bardziej czytelna,
 - Wstęp liczy aż 27 stron i zawiera głównie przegląd literatury. Moim zdaniem należało wyodrębnić rozdział „Przegląd literatury”, a Wstęp powinien stanowić wprowadzenie do całości pracy i nie powinien być dłuższy niż 2 strony,
 - zastosowanie pionowej orientacji podpisów pod rysunkami obniża ich czytelność na wydruku i utrudnia odbiór (np. Rysunek 4.7)
 - sugeruję zmienić tytuł rozdziału 3.2. „Próbki biomasy” na „Podstawowy materiał badawczy”
 - w pracy należy przytoczyć polskie nazwy roślin, zabrakło polskiej nazwy dla *Jatropha curcas*. Nazwy systematyczne w języku łacińskim powinny być podane w metodyce pracy w rozdziale ‘Podstawowy materiał badawczy’
 - w pracy do oznaczenia jednostek objętości (litr) należy stosować małą literę l zamiast wielkiej litery (L),

- strona 16, linia 21 zamiast $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{dzień}^{-1}$ powinno być $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$,
- skrót VFA należy zastąpić skrótem LKT (Lotne kwasy tłuszczowe),
- w tytułach rozdziałów nie powinno być kropek (np. str. 25),
- w pracy powinno wystrzegać się kolokwializmów zamiast „hodowano przez noc” powinno być „honowano przez 12 godzin” (str. 60, w. 11)

Poczynione przeze mnie uwagi w większości dyskusyjne i uściślające, nie obniżają wartości przedłożonej do oceny pracy. W mojej opinii praca jest bardzo wartościowa. Widać w niej dobry plan badawczy i konsekwentną realizację eksperymentów. Silną stroną jest dobra prezentacja wyników i ich szerokie omówienie. Świadczy to o dojrzałości naukowej Autora i o jego dobrym przygotowaniu merytorycznym i warsztatowym. Wyniki badań noszą znamiona oryginalności i nowości naukowej. Praca zawiera bogaty, a przy tym interesujący zarówno z poznawczego jak i praktycznego punktu widzenia materiał dokumentacyjny.

Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową pracy i zawarte w niej elementy nowości naukowej oraz szeroki zakres wykonanych eksperymentów i umiejętności logicznej interpretacji wyników oraz właściwego wnioskowania stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska w pełni spełnia wymagania stawiane w ustawie o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. nr 65 poz. 595) wraz z późniejszymi zmianami. Wnioskuje zatem do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Sławomira Jabłońskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Paweł Cyplik