

dr hab. inż. Jakub DREWNOWSKI , prof. PG

Gdańsk, 01.08.2025 r.

Politechnika Gdańska

Wydział Inżynierii Lądowej i Środowiska

Katedra Inżynierii Środowiska

Ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk

Tel.: +48 58 348-63-62

E-mail: jdrewnow@pg.edu.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Martyny Godzieby

**pt. „Wykorzystanie sieci społecznych do badania wzorców
współwystępowania bakterii przekształcających związki azotu w układach
oczyszczania ścieków”**

(ang. Utilizing social networks to study co-occurrence patterns of nitrogen-converting
bacteria in wastewater treatment systems)

Promotor pracy: prof. dr hab. inż. Sławomir Ciesielski

Katedra Biotechnologii w Ochronie Środowiska

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

1. Podstawa opracowania recenzji rozprawy doktorskiej

Niniejsza recenzja została opracowana na zlecenie Pana dr hab. inż. Dariusza Popielarczyka, prof. UWM, Dziekana Wydziału Geoinżynierii, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie na podstawie UMOWY O DZIEŁO NR 3/29.400.001/2025/D zawartej dnia 09/06/2025.

2. Uzasadnienie celowości podjęcia tematu rozprawy doktorskiej

Obecnie szeroko definiowana jest potrzeba badań zmierzających do identyfikacji złożonych społeczności mikroorganizmów, które odgrywają zasadniczą rolę w obiegu pierwiastków takich jak azot, węgiel czy fosfor zarówno w ekosystemach naturalnych, jak i inżynieryjnych, m.in. w wielu

różnych procesach technologicznych związanych z ochroną środowiska i gospodarką wodną (np. oczyszczalnie ścieków, w tym produkcja biogazu, procesy bioremediacji gleb czy kompostowanie odpadów organicznych (źródło: Gaspari i in., 2021; Li i in., 2023; Xiong i in., 2024). Procesy te bazują na zdolności mikroorganizmów do pracy w zespołach, w których różne mikroorganizmy wykorzystują produkty przemian poszczególnych członków społeczności, które tworzone są zazwyczaj przez setki różnych rodzajów grup bakteryjnych współpracujących między sobą i/lub konkurujących o dostępną przestrzeń, substraty pokarmowe oraz tlen. Mechanizmy tych ekologicznych interakcji są bardzo zróżnicowane, a ich poznanie i zrozumienie jest istotne do właściwego zarządzania procesami technologicznymi wykorzystującymi mikroorganizmy.

Dlatego też badania prezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej nad zespołami mikroorganizmów, uważam za celowe, gdyż mogą przyczynić się do rozwoju wielu różnych dziedzin nauki. Potwierdzają to m.in. badania opisane w publikacjach: Kwiatkowska i Ormaniec, 2024; Suman i in., 2022. Ponadto, zanieczyszczenie antropogeniczne i idąca za nim degradacja środowiska naturalnego sprawia, iż szczególnie ważnym kierunkiem badań są prace nad mikrobiomami środowisk antropogenicznych podjęte w rozprawie doktorskiej przez Autorkę oraz opisane w pracy Shade, 2023. Z uwagi na szerokie wykorzystanie mikroorganizmów w wielu procesach biotechnologicznych, badania nad strukturą mikrobiomów oraz czynnikami wpływającymi na ich kształtowanie i różnicowanie, czy też prace nad przyczynami potencjalnych zaburzeń są niezbędne dla dalszego rozwoju nauki i technologii związanych z biogospodarką zarówno w środowisku przyrodniczym, jak i w przemyśle. Wobec powyższego, celowość podjęcia pracy doktorskiej o tej tematyce uważam za w pełni uzasadnioną.

3. Ogólna charakterystyka rozprawy doktorskiej

Rozprawę doktorską przygotowano w postaci manuskryptu w języku polskim, składającego się z 52 stron i załączników w postaci oświadczeń współautorów publikacji wraz z towarzyszącym cyklem 4 artykułów naukowych powiązanych tematycznie o indywidualnym wkładzie Autorki, stanowiącym co najmniej 55%. Sumaryczny Impact Factor (IF) opublikowanych wyżej wymienionych publikacji zgodnie z bazą JCR to: 21,3, natomiast sumaryczna liczba punktów MNiSW opublikowanych ww. prac wynosi 440. Wg Autorki IF i sumaryczna liczba punktów MNiSW zostały obliczone uwzględniając punktację z dnia publikacji.

W głównym tekście opracowania, obejmującym 43 strony maszynopisu rozprawy doktorskiej zawarto streszczenie wraz ze słowami kluczowymi w języku polskim i angielskim oraz 7 rozdziałów, w skład których wchodzi: 1. *Wstęp*, 2. *Cel i zakres badań*, 3. *Hipotezy badawcze*, 4. *Materiały i metody*, 5. *Wyniki*, 6. *Weryfikacja hipotez*, 7. *Podsumowanie i wnioski*. Układ pracy jest prawidłowy i zawiera właściwy dla rozprawy doktorskiej przedstawiony syntetycznie opis tematyki pracy, hipotezy, materiały i metody badawcze wraz z opisem wyników i ich dyskusją popartą weryfikacją postawionych na początku hipotez oraz zakończoną podsumowaniem i wnioskami. Na pozostałych ostatnich 9 stronach rozprawy, można znaleźć jeszcze spis literatury i rysunków. Punkt 8. *Spis literatury*, zawiera ok. 86 pozycji, co w mojej ocenie jest dość skromny jak na takie opracowanie, zwłaszcza, że co najmniej 4 pozycje należą do samej Autorki. Niemniej jednak, należy podkreślić fakt, że większość pozycji obejmuje najnowsze badania, nie starsze niż 5 lat, opisane w prestiżowych czasopismach zagranicznych JCR z tzw. „listy filadelfijskiej” posiadających IF, co potwierdza znaczenie i aktualność przeprowadzonych badań. Ostatnia, 53 strona pracy to punkt 9. *Spis rysunków*, które

uzupełniają tekst i są w ilości tylko 5 sztuk, powtórzonych głównie z własnych publikacji dołączonych do rozprawy doktorskiej. Strona graficzna budzi pewien niedosyt, a Doktorantka mogłaby pokusić się o przygotowanie i zamieszczenie rysunków, które stanowiłyby kompilację wyników uzyskanych w różnych publikacjach. Praca zyskałaby również na wartości po dodaniu tabel, które wprawdzie występują w dołączonych publikacjach, ale moim zdaniem powinny znaleźć się także w głównym tekście rozprawy doktorskiej. Szczególnie dotyczy to wyników efektywności procesów usuwania azotu w połączeniu ze strukturą członków konsorcjów odpowiedzialnych za nitryfikację.

We wprowadzeniu ogólnym, rozdział 1. *Wstęp*, przedstawiono schemat obiegu azotu w przyrodzie w tym w systemach oczyszczania wody i ścieków. Wskazano na znaczenie związków azotu jako bardzo ważnego składnika biogenego w zbiornikach wodnych, a także na istotną rolę bakterii utleniających azotyny (NOB), których procesy metaboliczne nie zostały w pełni rozpoznane. Scharakteryzowano procesy stosowane zarówno w systemach opartych na osadzie czynnym, jak i błonie biologicznej służące do oczyszczania ścieków o zróżnicowanym poziomie stężenia azotu amonowego. W kolejnych dwóch podrozdziałach: 1.1. *Zależności ekologiczne w zespołach mikroorganizmów* i 1.2. *Bakterie przekształcające związki azotowe w układach oczyszczania ścieków*, zaprezentowano nowe procesy związane z cyklem azotu, aktualnie badane i wdrażane we współczesnych systemach oczyszczania, będące obiecującą alternatywą dla klasycznych (tradycyjnych) procesów nitryfikacji/denitryfikacji. Ponadto przedstawiono m.in. wiedzę na temat takich niekonwencjonalnych procesów usuwania azotu, opartych na skróconej ścieżce przemiany azotu jak np. deamonifikacja, znana również jako częściowa nitryfikacja i „beztlenowe” utlenianie amoniaku (anammox) lub częściowa denitryfikacja-anammox (ang. „nitrite shunt”, „partial nitrification- anammox” - PN/A, „partial denitrification-anammox” - PdN/A). Wskazano, że niosą one za sobą wiele korzyści m.in. są bardziej ekonomiczne, gdyż zużywają mniejsze ilości tlenu i umożliwiają zredukowanie produkcji ilości osadu. Zdefiniowano główne wyzwania stojące przed wdrożeniem procesów usuwania azotu do oczyszczania ścieków, jak i podstawowe czynniki mające wpływ na aktywność bakterii nitryfikacyjnych, m.in. temperatura, odczyn pH (w tym zasadowość), stężenie tlenu rozpuszczonego czy dostępność substratu azotowego. Przedstawiono zakres stosowalności procesu nitryfikacji w odniesieniu do oczyszczania wody i ścieków oraz wady i zalety stosowanych obecnie rozwiązań technologicznych, gdzie zwrócono uwagę na takie cechy procesu jak energochłonność oraz konieczność zapewnienia odpowiednich warunków. Podkreślono, że istotnym ograniczeniem w stosowaniu konwencjonalnych procesów biologicznego usuwania azotu jest podwyższone jego stężenie w ściekach. Jednocześnie wskazano, że skuteczne usuwanie azotu, którego stężenie w odpływie jak powszechnie wiadomo podlega regulacjom prawnym, jest istotne również z punktu widzenia projektowania nowych i modyfikacji istniejących systemów oczyszczania ścieków, w których należy uwzględnić szybkość zachodzących procesów biochemicznych. Obok tradycyjnych procesów usuwania azotu w pracy zaprezentowano najnowszy stan wiedzy dotyczący alternatywnych procesów takich jak nitrytacja i denitrytacja, częściowa nitrytacja/anammox oraz comammox, w ramach którego realizowane jest bezpośrednie utlenianie amoniaku do azotanów. W dalszej części omówiono czynniki wpływające na proces skróconej nitryfikacji, takie jak stężenie tlenu rozpuszczonego, odczyn pH, inhibicja substratowa. Na końcu części poświęconej nitryfikacji omówiono zidentyfikowane grupy metaboliczne mikroorganizmów prowadzących ww. rozważane procesy dot. możliwych przemian azotu (ang. autotrophic ammonia-oxidizing bacteria – AOB, heterotrophic ammonia-oxidizing bacteria – HAOB, ammonia-oxidizing archaea – AOA, nitrite-oxidizing bacteria – NOB, complete ammonia oxidizers - Comammox). W dalszej części 1.3. *Sekwencjonowanie nowej generacji*, omówiono rozwój technologii

sekwencjonowania DNA, która znacznie ułatwia badanie złożonych społeczności bakterii. Szczególnie przydatne podejście opiera się na analizie DNA pochodzącego bezpośrednio ze środowiska, tj. DNA metagenomowego. Sekwencjonowanie całego metagenomu generuje ogromną ilość informacji na temat całej społeczności mikroorganizmów i pozwala określić jej skład taksonomiczny. Jak pisze Autorka do profilowania mikrobiomów stosuje się najczęściej podejście wykorzystujące sekwencjonowanie genów markerowych, np. 16S rRNA lub sekwencjonowanie całego metagenomu metodą tzw. „shotgun”. Ostatni podrozdział części *Wstępu* 1.4. Sieci społeczne w badaniach mikrobiologicznych, dotyczy zagadnień związanych z ekologicznymi relacjami między mikroorganizmami w systemach oczyszczania wody i ścieków, które są złożone i podlegają wpływom wielu czynników procesów usuwania azotu w oczyszczalniach ścieków. Dzięki postępowi w technologiach sekwencjonowania kwasów nukleinowych i rozwojowi narzędzi metaomicznych wiedza na temat składu gatunkowego oraz procesów zachodzących w różnych społecznościach mikroorganizmów znacznie wzrosła. Ponadto, ogromna ilość danych uzyskanych dzięki technikom metaomicznym pozwala na dalsze badania dynamiki populacji oraz zależności ekologicznych członków złożonych zespołów mikroorganizmów. Jedną z metod badania społeczności mikrobiologicznych jest tworzenie sieci społecznych SNA (ang. social network analysis). Taki rodzaj analizy wykorzystywany jest w badaniach socjologicznych, a od niedawna znajduje też zastosowanie w badaniach dotyczących ekologii mikroorganizmów. Sieci współwystępowania mogłyby posłużyć jako cenne narzędzia do modelowania potencjalnych interakcji między mikroorganizmami, ale interpretacja zaobserwowanych powiązań wymaga dogłębniejszej analizy całego środowiska. Rozwój metod mapowania sieci ekologicznych społeczności mikrobiologicznych może pomóc w przewidywaniu skutków zmian i zaburzeń w ekosystemach, a także umożliwi projektowanie i manipulowanie złożonymi społecznościami mikrobiologicznymi.

Kolejny rozdział 2. *Cel i zakres badań*, przedstawia możliwości zastosowania analizy sieci współwystępowania mikroorganizmów do badania zależności ekologicznych i powiązań pomiędzy bakteriami przekształcającymi związki azotowe w wybranych środowiskach, opierających się na bioreaktorach wykorzystywanych do oczyszczania wody i ścieków. Badania prowadzono w reaktorach zróżnicowanych pod względem ich zastosowania, typu biomasy i zastosowanych parametrów, co determinowało rodzaj zachodzących procesów przemiany związków azotowych. Zakres badań obejmował m.in. ekstrakcję kwasów nukleinowych i ich analizę ilościową i jakościową, rozszerzoną o analizę strukturalną i funkcjonalną uzyskanych sekwencji nukleotydowych z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych, charakterystykę taksonomiczną i funkcjonalną zbiorowisk bakteryjnych oraz zależności występujących pomiędzy mikroorganizmami w oparciu o analizę sieci współwystępowania.

Następnie Autorka w kolejnym 3 rozdziale rozprawy doktorskiej postawiła poniższe hipotezy badawcze: H1.: Błona biologiczna (biofilm) jest bardziej zróżnicowana pod względem składu bakterii niż osad czynny, co znajduje odzwierciedlenie w strukturze sieci, H2.: Stężenie związków azotowych wpływa na skład populacji nityfikatorów, H3.: Dostępność substratów pokarmowych wpływa na zależności ekologiczne między mikroorganizmami, H4.: W procesach oczyszczania wody i ścieków bakterie nityfikacyjne stanowią kluczowe więzy sieci, H5.: Sieciowanie pozwala uzyskać unikalne informacje o interakcjach między członkami społeczności bakteryjnych.

Rozdział 4, zawierający opis materiałów i metod przeprowadzonych badań, prezentuje sposób pozyskania i wykorzystane w pracy dane eksperymentalne pochodzące z testów laboratoryjnych,

obejmujących analizę zespołów mikroorganizmów w czterech typach bioreaktorów. Dwa z nich stanowiły reaktory SBR (ang. Sequencing Batch Reactor), w tym IFAS-MBSBBR (ang. Integrated Fixed-Film Activated Sludge - Moving Bed Sequencing Batch Biofilm Reactor) zasilane ściekami syntetycznymi o parametrach zbliżonych do ścieków komunalnych (ChZT 510 mg O_2/l , TN 60 mg N/l , 40 mg $\text{NH}_4^+-\text{N/l}$, 8 mg $\text{PO}_4^{3-}-\text{P/l}$, pH 7,7), których przygotowanie opisano dokładnie w dwóch pierwszych publikacjach dołączonych do pracy doktorskiej oznaczonych (P1 i P2). W kolejnych dwóch publikacjach (P3 i P4), badano bakterie mikrobiomu oczyszczających wodę w recyrkulacyjnych systemach hodowli ryb (tj. trawianek oraz karp i jesiotrów), przy użyciu specjalnie przygotowanych przenośnych biofiltrów kanistrowych Katedry Ichtiologii i Akwakultury, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

W pracy (P1) przedstawiono badania reaktora IFAS-MBSBBR Zakładu Zaopatrzenia w Wodę i Odprowadzania Ścieków Politechniki Warszawskiej, gdzie przeprowadzone badania dotyczyły mikrobiomu rozwijającego się w postaci osadu czynnego i biofilmu w reaktorze hybrydowym ze złożem ruchomym IFAS-MBSBBR. Reaktor miał objętość 28 l i zawierał nośniki cylindryczne z tworzywa sztucznego EvU Pearl, na których rozwijał się biofilm o stężeniu osadu czynnego na poziomie około 1,7 g MLSS/l. Działanie IFAS-MBSBBR było w pełni zautomatyzowane i kontrolowane za pomocą oprogramowania DreamSpark Premium (system SCADA), co pozwoliło, aby reaktor pracował w systemie 3 ośmiogodzinnych cykli na dobę. Pojedynczy cykl oczyszczania obejmował następujące fazy: I faza bez napowietrzania z dozowaniem ścieków (50 min), I faza tlenowa (190 min), II faza bez napowietrzania z dozowaniem ścieków (30 min), III faza tlenowa (150 min), sedymentacja (50 min), dekantacja (10 min). Eksperyment prowadzono przez 573 dni, podczas których zmieniano strategię napowietrzania oraz stężenie tlenu. Podczas pierwszych 42 dni eksperymentu prowadzono napowietrzanie ciągłe, a stężenie tlenu wynosiło 3 mg O_2/l . W kolejnych etapach prowadzono napowietrzanie naprzemienne w fazach tlenowych, stopniowo zmniejszając stężenie tlenu oraz skracając długość napowietrzania. Następną publikacją (P2) przedstawia wyniki badań reaktora SBR Katedry Inżynierii Sanitarnej, Wydziału Inżynierii Lądowej i Środowiska, Politechniki Gdańskiej. W tym przypadku pobierano próbki biomasy z reaktora, w którym prowadzono proces deamonifikacji w różnych warunkach temperaturowych. Temperaturę procesu stopniowo obniżano, a każdą z zadanych temperatur utrzymywano aż do ustabilizowania procesu, co weryfikowano na podstawie szybkości zużycia azotu amonowego NH_4^+-N (AUR), szybkości przyrostu azotu azotanowego NO_3^--N (NPR), szybkości przyrostu azotu azotynowego NO_2^--N (NiPR) oraz szybkości zużycia azotu azotynowego NO_2^--N (NiUR). Eksperyment prowadzono w sumie przez 118 dni, w coraz niższych temperaturach: 30 °C (20 dni), 25 °C (23 dni), 20 °C (21 dni), 15 °C (35 dni), 12 °C (19 dni). Próbki biomasy do analiz mikrobiologicznych pobierano tydzień po przejściu na nowy poziom temperatury. Reaktor miał objętość 10 l i zaszczipiony został inokulum wzbogaconym w bakterie anammox, pochodzącym z bocznego ciągu miejskiej oczyszczalni ścieków w Słupsku. Do reaktora doprowadzano nieorganiczne ścieki syntetyczne o składzie zgodnym z rekomendowanym przez Dapena-Mora i in. i wzbogacanych amoniakiem (500 mg N/l). Wartości pH utrzymywano pomiędzy 7,5 a 7,8 poprzez dodawanie 1 M HCl. Całkowity ładunek azotu (TN) wahał się od 0,1 do 1,5 gN/l, w zależności od aktywności i temperatury w reaktorze. Pojedynczy cykl operacyjny trwał 6 godzin, który podzielono na 4 etapy: napełniania (20 min), reakcji (300 min), sedymentacji (20 min) i dekantacji (20 min). W kolejnej serii badań wykorzystano przenośne ww. biofiltry kanistrowe Katedry Ichtiologii i Akwakultury Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Pracowały one w recyrkulacyjnym systemie wykorzystywanym do chowu trawianek (P3) oraz w recyrkulacyjnym

systemie do chowu karpi i jesiotrów (P4). Materiał do badań pochodził z filtra kanistrowego EHEIM Professional 3 (model 1200XLT) o pojemności 13,5 l. Biofiltr zawierał trzy rodzaje materiału filtracyjnego. Dolna część wypełniona została kulistymi kształtkami wykonanymi z PCV o średnicy ok. 1,5 cm i powierzchni z licznymi kanalikami. Środkowa część filtra wypełniona była pustymi w środku ceramicznymi cylindrami, natomiast górna porowatą gąbką. Woda z akwarium była pompowana do dolnej części filtra, a oczyszczona woda odprowadzana z górnej części filtra z powrotem trafiała do akwarium. Dokładnie omówiono pochodzenie i sposób pobierania próbek. Na podstawie wspomnianych danych przeprowadzono ekstrakcję kwasów nukleinowych w podrozdziale 4.2 oraz 4.3 *sekwencjonowanie metodą Illumina oraz analizę sekwencji kwasów nukleinowych*. Szczegółowy opis wykonanych procedur bioinformatycznych oraz użytych do tego celu narzędzi został przedstawiony w sekcji *Materiały i metody* każdej publikacji z cyklu. Na zakończenie tego rozdziału pojawia się podrozdział 4.4. *Konstrukcja sieci współwystępowania*, opisujący jak ją skonstruowano na podstawie analizy korelacji poszczególnych rodzajów bakterii. Do analizy wybrano takie rodzaje bakterii, które w badanych metagenomach były najliczniejsze. Korelację rang Spearmana obliczano przy użyciu programu Statistica (wersja 13.1, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA), a otrzymane macierze korelacji wykorzystano do konstrukcji sieci za pomocą oprogramowania Gephi (wersja 0.10.1), w którym obliczono podstawowe statystyki sieci dla silnie skorelowanych taksonów ze współczynnikami korelacji $> 0,75$ lub $< -0,75$.

W części zawierającej wyniki badań przedstawione zostały rezultaty ww. eksperymentów odnoszące się do załączonego w rozprawie doktorskiej zbioru 4 artykułów naukowych spójnych tematycznie oznaczonych jako P1, P2, P3, P4. W wyniku analizy danych uzyskanych z sekwencjonowania amplikonów genu 16S rRNA, w reaktorze IFAS-MBSBBR zidentyfikowano łącznie 26 typów i 783 rodzajów bakterii. Zarówno w biofilmie, jak i w osadzie czynnym, najliczniejszymi typami były *Pseudomonadota*, oraz *Bacteroidota*. Ponadto biofilm charakteryzował się istotnie statystycznie większą liczebnością *Chlorofexi*, *Acidobacteriota* i *Nitrospirota*, natomiast osad czynny większą liczebnością *Firmicutes*. Taki skład bakteryjny jest typowy dla reaktorów zasilanych ściekami komunalnymi. Ponadto skonstruowano dwie sieci współwystępowania bakterii obrazujące społeczności bakteryjne biofilmu (Rys. 1) i osadu czynnego (Rys. 2). Obie sieci miały taką samą liczbę węzłów (83), ale sieć biofilmu miała więcej krawędzi, co może świadczyć, o większej ilości zależności ekologicznych między bakteriami biofilmu niż osadu czynnego. W sieci biofilmu znajdowały się cztery węzły (*Diaphorobacter*, *Rhizorapis*, *Mesorhizobium* i *Pseudoxanthomonas*) mające liczne bezpośrednie powiązania z innymi węzłami sieci. Co jest szczególnie istotne do konstrukcji sieci wykorzystano również dane o wydajności usuwania związków organicznych i fosforowych, amonifikacji, nitrifikacji i denitrifikacji. Analiza sieci wykazała, że pozytywne powiązania między liczebnością bakterii a wydajnością usuwania związków azotu i fosforu były częstsze w społeczności biofilmu niż w społeczności osadu czynnego. Doktorantka wskazała, że biofilm jest lepszym środowiskiem dla wzrostu bakterii zdolnych do rozkładu tych związków. Hipotezę tą potwierdza również większy udział w biofilmie takich bakterii jak *Nitrospira*, *Nitrosomonas* czy *Candidatus Accumulibacter*. Analiza wszystkich sieci wykazała również różnice w modularności sieci populacji bakteryjnych rozwijających się w reaktorach o różnym obciążeniu. W (P1) i (P2) liczba modułów w sieciach była wyższa (5-6) niż w (P3) i (P4). Ponadto w sieciach (P1 i P2) powiązania między węzłami zarówno wewnątrz, jak i pomiędzy modułami, były dodatnie jak i ujemne. W sieciach (P3 i P4) korelacje wewnątrz modułów były głównie dodatnie, natomiast pomiędzy modułami ujemne. Taki

układ sieci wskazuje, że dostępność substratów pokarmowych wpływa na zależności ekologiczne między mikroorganizmami, co odpowiada postawionej w pracy doktorskiej hipotezie (H3).

Dalsza część pracy stanowi dyskusję otrzymanych wyników w świetle postawionych hipotez. Ta część pracy została tematycznie podzielona na zagadnienia związane z wpływem stężenia tlenu rozpuszczonego na wyniki uzyskane za pomocą opracowanych metod sieci społeczności, wpływem parametrów modelu na uzyskiwane wyniki badań, rozbudową nitryfikacji o ścieżkę procesu comammox, a także innowacyjności oraz wpływem przeprowadzonych badań na technologię oczyszczania ścieków. Całość pracy podsumowują wnioski powiązane z celem głównym i celami dodatkowymi oraz hipotezami postawionymi na początku rozprawy doktorskiej.

4. Merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej

Tytuł rozprawy doktorskiej „Wykorzystanie sieci społecznych do badania wzorców współwystępowania bakterii przekształcających związki azotu w układach oczyszczania ścieków” (ang. Utilizing social networks to study co-occurrence patterns of nitrogen-converting bacteria in wastewater treatment systems) jest w pełni zgodny z treścią opracowania i omawia zagadnienia związane z usuwaniem związków azotu w wybranych układach oczyszczania ścieków. Związki azotu zawarte w ściekach, głównie w postaci amoniaku, azotynów i azotanów, stanowią podstawowe źródło zanieczyszczenia wód gruntowych i powierzchniowych, powodując m.in. eutrofizację zbiorników wodnych, stąd proces nitryfikacji jest ważnym etapem cyklu azotowego w środowisku naturalnym. Dotychczas nitryfikację uważano za proces dwuetapowy, który zachodzi przy udziale różnych grup mikroorganizmów, tzw. populacje nitryfikatorów, które najczęściej tworzą bakterie AOB (np. *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosococcus* (źródło: Soliman i Eldyasti, 2018)), NOB (ich przedstawicieli można znaleźć wśród alfa-, beta-, delta- i *gamma-proteobacteria*) oraz w typie *Nitrospirota* (źródło: Al-Ajeel i in., 2022), bakterie comammox *Nitrospira* (źródło: Daims i in., 2015; van Kessel i in., 2015) i archeony z typu *Thaumarchaeota* (źródło: Pester i in., 2011). Jednakże całkowity proces nitryfikacji, tj. utlenianie amoniaku bezpośrednio do azotanów (ang. *comammox*), przez tylko jeden rodzaj mikroorganizmów należących do *Nitrospira* sp., został eksperymentalnie potwierdzony zaledwie kilka lata temu. Odkrycie to nadaje nowy wymiar bieżącemu zrozumieniu cyklu przemian azotu (zwłaszcza klasycznej nitryfikacji). Ponadto, daje to również możliwość zrewidowania podejścia do zarządzania procesem usuwania azotu w systemach oczyszczania ścieków wykorzystujących nowe procesy oparte na odkryciu procesu anammox (ang. anaerobic ammonia oxidation), co zostało potwierdzone po raz pierwszy w 1994 roku przez Muldera i in. (podczas badań na denitryfikacyjnym złożu fluidalnym, które opublikowano rok później w dziele pt. „Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor” przez zespół naukowców w składzie Mulder A., van de Graaf A.A., Robertson L.A., Kuenen J.G. w czasopiśmie naukowym FEMS Microbiol. Ecol. 1995; 16 (3): 177–184.), takie jak deamonifikacja i/lub skrócona nitryfikacja/denitryfikacja poprzez azotyny (tzw. ang. “nitrite shunt”). Pomimo iż istnienie ww. zespołów mikroorganizmów w systemach oczyszczania ścieków opartych na osadzie czynnym (w tym też błonie biologicznej) zostało wprowadzie już wielokrotnie potwierdzone w różnych publikacjach polskich i zagranicznych, ale ich znaczenie i związki między tymi grupami bakterii zwłaszcza “comammox” *Nitrospira* w procesie usuwania azotu nie zostało jeszcze w pełni zbadane i rozpoznane. W związku z tym, głównym celem pracy doktorskiej była identyfikacja, scharakteryzowanie i wykrycie powiązań sieci społecznych do badania wzorców współwystępowania

bakterii przekształcających związki azotu w cyklu jego przemian w różnych systemach oczyszczania ścieków. Stąd, Autorka w rozprawie doktorskiej weryfikowała wcześniej podane hipotezy badawcze.

Hipotezy badawcze zostały postawione prawidłowo i właściwie opisane językiem naukowo-badawczym. W ramach pracy założono, że różne układy laboratoryjne (tj. sekwencyjny reaktor biologiczny SBR, jak i np. reaktor IFAS ze złożem ruchomym) będą obsługiwane równolegle, a systemy te będą wykorzystywać różne typy biomasy (biomasa zawieszona i biofilm, osad granulowany) oraz różne procesy usuwania azotu oparte na skróconej ścieżce przemiany azotu (częściowa nitrifikacja, deamonifikacja). W celu wiarygodnego porównania, oba systemy były zasilane takimi samymi odciekami syntetycznymi, imitującymi skład ścieków komunalnych i odcieków z beztlenowych komór fermentacyjnych. Ponadto oba układy laboratoryjne pracowały z zastosowaniem podobnych parametrów technologicznych, takich jak temperatura, dostępność substratu, stężenie tlenu rozpuszczonego i strategia napowietrzania (ciągłe i przerywane). Wydajność obu systemów została porównywana pod względem efektywności usuwania azotu, inhibicji i wypłukiwania bakterii utleniających azotyny (NOB) oraz składu mikrobiologicznego (ze szczególnym uwzględnieniem „comammox” *Nitrospira*). Ponadto w odniesieniu do ww. eksperymentów naukowych zastosowano dwie zaawansowane techniki mikrobiologiczne, takie jak metagenomika i metatranskryptomika. Zastosowanie metagenomiki pozwoliło scharakteryzować społeczności mikroorganizmów rozwijające się w badanych reaktorach, z kolei zastosowanie metatranskryptomiki pozwoliło określić aktywność genów funkcjonalnych związanych z metabolizmem azotu (*amoA*, *nxr*, *hao*, *nirK* i *hzsA*). W celu zrozumienia związków między grupami bakterii obecnych w badanych reaktorach, a także optymalizacji parametrów technologicznych umożliwiających wzrost efektywności usuwania azotu, przeprowadzone zostały analizy bioinformatyczne.

Opiniowana praca doktorska, w pełni wpisuje się w obecne trendy prowadzonych badań naukowych, gdyż zarówno przedstawia możliwości wykorzystania bakterii anammox, jak i towarzyszącym temu zjawisku alternatywnym niskoenergetycznym procesom np. deamonifikacji (czyli częściowej nitrifikacji i beztlenowemu utlenianiu amoniaku „anammox”) w obszarze koncepcji oczyszczania wody i/lub ścieków. Równolegle w tej pracy można znaleźć również aktualne tematy, ukazujące możliwe kierunki rozwoju i ewentualnego przekształcenia procesów oczyszczania ścieków w innowacyjne rozwiązania w obliczu nowoczesnej gospodarki cyrkularnej. Wprawdzie Autorka nie uwzględnia wszystkich zagadnień dotyczących usuwania azotu w procesie jego przekształcania, czego jak sądzę jest w pełni świadoma. Niemniej jednak, praca została napisana głównie w celu uzupełnienia opublikowanych dotychczas opracowań i wiedzy o nowe elementy na temat optymalnych wartości wybranych parametrów technologicznych procesów częściowej nitrifikacji i anammox (ang. partial nitritation/anammox, PN/A), w odniesieniu do efektywności i wydajności usuwania azotu (autotroficznej deamonifikacji) z „głównego strumienia ścieków” w bioreaktorach hybrydowych typu „złożo biologiczne z ruchomym wypełnieniem – osad czynny” IFAS (z ang. integrated fixed film activated sludge). Zaprezentowany w pracy doktorskiej zakres informacji miał także na celu w pewien sposób przybliżyć zagadnienia związane ze złożonością procesów częściowej nitrifikacji i anammox, ich zaletami i rolą jaką mają pełnić przy realizacji koncepcji oczyszczania wód i ścieków. Przy okazji Autorka starała się wyjaśnić i omówić jak wyglądają w praktyce różnice pomiędzy systemami opartymi na osadzie czynnym i biofilmem. Ponadto przedstawiono podstawowe wyzwania związane z zastosowaniem tej technologii, zwłaszcza w pełnej skali do usuwania azotu oraz możliwe metody ich rozwiązania w zakresie kilku fundamentalnych zagadnień dzięki omówieniu w niej konkretnych przykładów z obiektów do oczyszczania ścieków i/lub oszczędności energii czy też

ewentualnie odzysku zasobów. Przy okazji produkcji oczyszczonej wody ze ścieków, wykorzystywane są procesy anammox (m.in. SBR, w tym dot. PN/A w systemach IFAS) do usuwania azotu w gospodarce ściekowej zarówno w kontekście naszego kraju, jak i szerzej w UE, które mogą stanowić dobry przykład praktycznych zastosowań. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że Autorka przedstawiła także przykładowe wymagania odnośnie gospodarki wodno-ściekowej, jak i częściowo wybrane aspekty bioinformatyki w tym modelowania matematycznego procesów częściowej nitryfikacji i anammox w błonach biologicznych. Z użyciem ww. metod zostały wyznaczone optymalne wartości wybranych parametrów technologicznych procesów PN/A i efektywności usuwania azotu z głównego strumienia ścieków w bioreaktorach SBR i IFAS MBSBBR. Co istotne, nie były to jedynie rozważania teoretyczne, gdyż analiza procesów PN/A została przeprowadzona z wykorzystaniem wyników uzyskanych z badań empirycznych. Przy tym, przedstawiono także typy różnych układów technologicznych, w których procesy PN/A są realizowane w pełnej skali technicznej do usuwania azotu z „cieczy osadowych” oraz te które są najbardziej obiecujące w odniesieniu do zastosowania autotroficznej deamonifikacji do oczyszczania głównego strumienia ścieków. Co istotne, w przypadku ocenianej pracy do wyjaśnienia skomplikowanych procesów biologicznych posłużono się metodami bioinformatycznymi w połączeniu z dogłębną analizą przy wykorzystaniu sieci społeczności SNA. Ponadto uważam, że bardzo cennym dla czytelników elementem są omówione przez Autorkę kierunki rozwoju technologii oczyszczania ścieków w zakresie użycia bakterii anammox i innych zmodyfikowanych nowoczesnych procesów do usuwania azotu ze ścieków opartych na wybranych społecznościach mikroorganizmów jako alternatywę do powszechnie stosowanych konwencjonalnych systemów nitryfikacji-denitryfikacji, jak i możliwe zrównoważone ekologicznie zagospodarowanie energii, czy też osadów ściekowych dot. GOZ w obszarze koncepcji Komunalnych Oczyszczalni Ścieków (KOŚ) jako „obiektów odzysku zasobów i energii” m.in.:

- zaawansowanych procesów usuwania azotu przy wykorzystaniu procesu anammox (w tym z tzw. skróconą ścieżką eliminacji N ze ścieków bez użycia tlenu rozpuszczonego), gdyż w typowych KOŚ dostarczenie tlenu wiąże się ze zużyciem energii elektrycznej, które często sięga 70% ogólnego zużycia energii przez cały zakład, a jednocześnie prowadząc taki proces jak anammox nie powodujemy dużego przyrostu biomasy, co generuje dodatkowe koszty związane z zagospodarowaniem nadmiernego osadu,

- nowoczesnych technologii obejmujących PN/A z użyciem zarówno osadu czynnego tradycyjnego w postaci kłaczek, jak i granulowanego czy też bioreaktorów typu IFAS-MBSBBR z biofilmem do oczyszczania ścieków, których zaletą jest fakt, że mikroorganizmy przeprowadzające ten proces nie wymagają związków organicznych, które są niezbędne dla bakterii denitryfikacyjnych, zwłaszcza iż w ostatnich latach skład ścieków charakteryzuje się niekorzystnymi relacjami pomiędzy ilością węgla organicznego w stosunku do azotu i wówczas realizacja procesu denitryfikacji heterotroficznej pociąga za sobą konieczność stosowania zewnętrznego źródła węgla organicznego, co również generuje dodatkowe koszty.

Ponadto dla porównania ww. badań w wybranych systemach oczyszczania ścieków Doktorantka opisała eksperymenty ze społecznościami bakterii usuwającymi azot, wykorzystując przenośne biofiltry kanistrowe Katedry Ichtiologii i Akwakultury Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, gdzie badano bakterie mikrobiomu biofiltrów oczyszczających wodę w recyrkulacyjnych systemach hodowli ryb.

Za główne osiągnięcia Autorki pracy uważam:

1. Potwierdzenie powszechność występowania procesu comammox w różnych systemach oczyszczania ścieków oraz genetyczne i funkcjonalne możliwości adaptacyjne bakterii *comammox* poprzez zastosowanie zintegrowanych zaawansowanych technik mikrobiologicznych.
2. Zastosowanie dogłębnej analizy sieci społecznych do wyjaśnienia procesów PN/A i comammox w bioreaktorach z osadem czynnym i/lub biofilmem w systemach SBR jak i hybrydowych typu IFAS-MBSBBR, co może przyczynić się do rozwinięcia pseudo-empirycznego modelu wyższego rzędu, w oparciu o który wyznaczone mogą być optymalne wartości wybranych parametrów technologicznych w wybranych systemach oczyszczania.
3. Udowodnienie, że biofilm rzeczywiście jest lepszym środowiskiem dla wzrostu bakterii comammox w systemach oczyszczania ścieków i potwierdzenie, że istnieją parametry technologiczne silnie wpływające na przeżywalność tych bakterii w badanych układach (stężenie azotu amonowego, stężenie tlenu rozpuszczonego, temperatura itp.), w tym też wykazanie comammox'u jako procesu mogącego konkurować z klasycznymi bakteriami NOB.
4. Wskazanie praktycznych możliwości zastosowania opracowanych metod oraz przyszłych kierunków badań bazujących na opisanych w rozprawie rezultatach i wnioskach.

5. Uwagi dyskusyjne

W pracy dostrzec można drobne błędy redakcyjne, m.in.:

1. nieodpowiednio użyte przecinki lub ich brak: w streszczeniu w wersji 3 brak jest przecinka przed "ale", za to w wersji 7 zamieszczono przecinek przed "oraz",
2. wiszące spójniki pojawiające się w całym tekście na końcu wersów (np. wers 20 w streszczeniu rozprawy),
3. drobne błędy stylistyczne, np. na str. 12 w pierwszym wersie w zdaniu "Nitryfikacja jest procesem w głównej mierze przeprowadzanej.... (powinno być np. "Nitryfikacja jest procesem w głównej mierze przebiegającym przy udziale..."),
4. długi i krótki myślnik - brak konsekwencji stosowania np. str. 32 a str. 25,
5. znak procent pisany raz ze spacją a czasami bez spacji np. str. 32.

Podczas analizowania pracy, nasunęły mi się uwagi, które byłoby warto przedyskutować podczas publicznej obrony:

1. W swojej pracy Doktorantka zamieściła informacje zarówno z zakresu sieci współwystępowania mikroorganizmów w biofiltrze oczyszczającym wodę w recyrkulacyjnym systemie wykorzystywanym do chowu trawianek oraz karp i jesiotrów odzwierciedlających procesy zachodzących w środowisku naturalnym, jak i bioreaktorach biofilmu i/lub osadu czynnego stosowanych w technologii biologicznego oczyszczania ścieków, zwłaszcza takich które charakteryzują się wysoką zawartością azotu amonowego. Analiza sieci współwystępowania jest obiecującym narzędziem umożliwiającym identyfikację potencjalnych zależności ekologicznych w populacjach bakteryjnych. Jak zrozumienie

zależności między funkcjonalnymi grupami mikroorganizmów może w przyszłości ułatwić sterowanie procesami biologicznego oczyszczania wody i ścieków nie tylko w warunkach laboratoryjnych, ale również przemysłowych?

2. W Polsce obecnie dąży się do powiązania aktualnych badań z GOZ tzw. „gospodarką obiegu zamkniętego”, a resortem koordynującym wdrażanie tej inicjatywy m.in. do gospodarki ściekowej jest Ministerstwo Rozwoju i Technologii, co jest zgodne z obowiązującą aktualnie dyrektywą Unii Europejskiej (UE) zmierzającą w niedalekiej przyszłości do przekształcenia wielu sfer gospodarki w działające wg schematu o obiegu zamkniętym. Jak te wyniki badań mogą przyczynić się do aktualnie prowadzonych prac, podczas gdy oficjalnym celem UE jest obecnie stopniowe dążenie do przekształcenia oczyszczalni ścieków w obiekty produkujące i/lub odzyskujące energię/surowce przy okazji procesów oczyszczania ścieków, co wiąże się z przechodzeniem na model GOZ, w tym ewentualnie czy mogą mieć też wpływ na przyspieszenie wdrażania GOZ w innych obiektach opisywanych w rozprawie doktorskiej np. hodowli ryb?

3. Korzyści z nowatorskich procesów usuwania azotu (np. deamonifikacja i “nitrite shunt”) wynikają z inhibicji procesu utleniania azotynów, który dotychczas przypisywano wzrostowi klasycznych bakterii NOB. Zwłaszcza deamonifikacja w głównym ciągu oczyszczania ścieków jest obiecującą nową koncepcją, która może zrewolucjonizować sposób usuwania azotu w oczyszczalniach ścieków. Proces commamox może negatywnie wpłynąć na wspomniane wcześniej, nowe procesy ze względu na rywalizację o ten sam substrat (amoniak). Wskutek tego, bakterie comammox mogą znacząco zakłócić produkcję azotynów w procesie częściowej nitryfikacji (nitrytacji), która jest etapem decydującym o skuteczności obu nowych procesów. Jakie znaczenie dla uzyskanych wyników badań sieciowania w pracy doktorskiej mają niskie wartości efektywności usuwania związków azotowych?

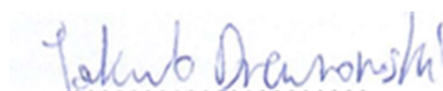
4. W publikacji (P2) stwierdzono niską efektywność procesów usuwania azotu, gdzie największy stopień miał węzeł reprezentujący temperaturę, co wskazuje na jego znaczący wpływ na wielu członków społeczności bakteryjnej. Jeżeli bakterie reagują w podobny sposób na presję czynnika środowiskowego (w tym przypadku np. spadek temperatury), pomiędzy ich liczebnością może pojawić się dodatnia korelacja, co może spowodować wzrost wielkości węzła. Poza tym wysoką centralnością mogą odznaczać się mikroorganizmy wytwarzające substancje stabilizujące strukturą agregatów mikrobiologicznych, takich jak biofilm, granule czy kłaczkosady czynnego. Takie bakterie pełnią istotną, ale też odmienną rolę w populacji bakteryjnej, ponieważ stwarzają odpowiednie środowisko rozwoju różnych grup bakterii. Ponadto stabilność mikroekosystemów jest wynikiem równowagi pomiędzy wieloma złożonymi procesami, a zależności w reaktorach oczyszczania ścieków mogą być dużo bardziej złożone i niekoniecznie wynikające bezpośrednio z cyklu azotowego. Czy opisywana w opracowaniu metoda analizy sieci społecznych współwystępowania konsorcjów bakterii nitryfikacyjnych i innych przekształcających azot uzyskana w wyniku zastosowania metod metagenomicznych daje gwarancję właściwej oceny wyników badań w układach oczyszczania ścieków? Jakie są ewentualne ograniczenia tego rodzaju podejścia?

6. Podsumowanie i wniosek końcowy

W podsumowaniu chciałbym podkreślić, że dobrze oceniam przedstawioną do recenzji pracę doktorską. Na tę ocenę wpływa zarówno wkład teoretyczny, doświadczalny, jak i prace mikrobiologiczne oraz bioinformatyczne, przeprowadzone z wykorzystaniem najnowszych technik badawczych. Zamieszczone w recenzji uwagi mają charakter dyskusyjny, mają również podkreślić

przyszłe kierunki i możliwości badań oraz zachęcić do wyraźniejszego podkreślania nakładu pracy własnych osiągnięć i możliwości zastosowania wyników badań. Uważam, że mgr inż. Martyna Godzieba rzetelnie przeanalizowała oryginalny problem naukowy, mający istotne znaczenie w dyscyplinie naukowej inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka, który został jasno sformułowany w przedłożonej rozprawie doktorskiej pt. „Wykorzystanie sieci społecznych do badania wzorców współwystępowania bakterii przekształcających związki azotu w układach oczyszczania ścieków” (ang. „Utilizing social networks to study co-occurrence patterns of nitrogen-converting bacteria in wastewater treatment systems”). Zakres tematyczny oraz wyniki badań przedstawione przez Doktorantkę wydają się szczególnie cenne w obecnym czasie, gdyż urządzenia pracujące w systemach oczyszczania ścieków powinny nie tylko zapewniać spełnienie wymagań stawianych jakości oczyszczanych ścieków odprowadzanych do odbiornika, ale także dążyć do minimalizacji nakładów energetycznych związanych z usuwaniem związków azotu. Warte podkreślenia jest, że Doktorantka wykazała się doskonałą umiejętnością planowania eksperymentów i prowadzenia pracy naukowej. Największą wartością pracy jest udowodnienie, że wykorzystanie metod sieciowania dostarcza nowych i istotnych informacji o zależnościach ekologicznych między bakteriami uczestniczącymi w procesach biologicznego oczyszczania ścieków.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca Pani mgr inż. Martyny Godzieby spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określonym w Art. 187 Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. 2024 poz. 157). Wniosuję, więc o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów procedowania przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na ambitny charakter postawionych hipotez i wysoką jakość uzyskanych wyników, wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr inż. Martyny Godzieby.



Prof. PG, dr hab. inż. Jakub DREWNOWSKI

Literatura:

- Al-Ajeel, S., Spasov, E., Sauder, L. A., McKnight, M. M., & Neufeld, J. D. (2022). Ammonia-oxidizing archaea and complete ammonia-oxidizing Nitrospira in water treatment systems. *Water Research X*, 15, 100131. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2022.100131>
- Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R. H., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P. H., & Wagner, M. (2015). Complete nitrification by Nitrospira bacteria. *Nature*, 528(7583), 5043509. <https://doi.org/10.1038/nature16461>
- Gaspari, M., Treu, L., Zhu, X., Palù, M., Angelidaki, I., Campanaro, S., & Kougias, P. G. (2021). Microbial dynamics in biogas digesters treating lipid-rich substrates via genome-centric metagenomics. *Science of The Total Environment*, 778, 146296. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146296>
- Kwiatkowska, K., & Ormaniec, P. (2024). Microbial succession on microplastics in wastewater treatment plants: Exploring the complexities of microplastic-microbiome interactions. *Microbial Ecology*, 87(1), 105. <https://doi.org/10.1007/s00248-024-02422-y>
- Li, F., Ghanizadeh, H., Cui, G., Liu, J., Miao, S., Liu, C., Song, W., Chen, X., Cheng, M., Wang, P., Zhang, Y., & Wang, A. (2023). Microbiome - based agents can optimize composting of agricultural wastes by modifying microbial communities. *Bioresource Technology*, 374, 128765. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128765>
- Pester, M., Schleper, C., & Wagner, M. (2011). The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 3003306. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.04.007>
- Shade, A. (2023). Microbiome rescue: directing resilience of environmental microbial communities. *Current Opinion in Microbiology*, 72, 102263. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102263>
- Soliman, M., & Eldyasti, A. (2018). Ammonia-Oxidizing Bacteria (AOB): opportunities and applications - a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 17(2), 2853321. <https://doi.org/10.1007/s11157-018-9463-4>
- Suman, J., Rakshit, A., Ogireddy, S. D., Singh, S., Gupta, C., & Chandrakala, J. (2022). Microbiome as a key player in sustainable agriculture and human health. *Frontiers in Soil Science*, <https://doi.org/10.3389/fsoil.2022.821589>
- van Kessel, M. A. H. J., Speth, D. R., Albertsen, M., Nielsen, P. H., Op den Camp, H. J. M., Kartal, B., Jetten, M. S. M., & Lückner, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 528(7583), 5553559. <https://doi.org/10.1038/nature16459>
- Xiong, F., Su, Z., Tang, Y., Dai, T., & Wen, D. (2024). Global WWTP microbiome-based integrative information platform: From experience to intelligence. *Environmental Science and Ecotechnology*, 20, 100370. <https://doi.org/10.1016/j.es.2023.100370>