dr hab. inż. Elżbieta Grabińska-Sota, prof. nzw. w Pol.Śl.
Politechnika Śląska
Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki
Katedra Biotechnologii Środowiskowej

Gliwice, 24.04.2016 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Justyny Klein

pt. „Wspomaganie usuwania wybranych węglowodorów z zastosowaniem mikroorganizmów wyizolowanych ze skażonego środowiska".

Podstawa opracowania recenzji

Recenzję pracy doktorskiej mgr inż. Justyny Klein opracowano zgodnie z uchwałą Rady Wydziału Inżynierii Środowiska, Geomatyki i Energetyki Politechniki Świętokrzyskiej, na podstawie pisma Pani Dziekan dr hab. Lidii Dąbek prof. Politechniki Świętokrzyskiej z dnia 01.03. 2016 r.

Celowość podjęcia tematu

Węglowodory alifatyczne i aromatyczne należą do głównej grupy związków chemicznych odpowiadających za zanieczyszczenie środowiska. Ich źródłem są procesy spalania paliw płynnych, piroliza węgla, a także procesy wydobywcze ropy, jej przerobu w rafineriach oraz awarie podczas transportu i magazynowania. Węglowodory ropopochodne, które przedostały się do środowiska, mogą wywołać różnego rodzaju skutki toksyczne i uniemożliwić wykorzystanie wód i gleb do celów komunalnych, przemysłowych i rolniczych. Ponadto liczne badania toksykologiczne i epidemiologiczne wskazują na wyraźną zależność pomiędzy ekspozycją na wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne a wzrostem ryzyka powstawania nowotworów. Ze względu na podobieństwo niektórych WWA do hormonów steroidowych występujących u bezkręgowców (np. ekdysteroidy) i kręgowców (np. estradiol), substancje te wpływają negatywnie na regulację hormonalną,

zaburzają osmoregulację, osłabiają reakcje odpornościowe i zwiększają przepuszczalność błon lizosomalnych, nasilając procesy lipoperoksydacji.

Istniejący stan zanieczyszczenia środowiska naturalnego stwarza więc potrzebę poszukiwania nowych informacji o metodach usuwania tych związków, nawet jeśli występują one w małych ilościach. Liczna grupa mikroorganizmów wykazuje możliwości rozkładu węglowodorów, jednak by procesy były efektywne, konieczne jest zapewnienie odpowiednich warunków środowiskowych sprzyjających procesom degradacji tych substancji, a jednocześnie promujących rozwój mikrobiocenoz o odpowiednim potencjale degradacyjnym w tym konsorcjów mikroorganizmów.

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że recenzowana praca dotyczy interesującego zagadnienia, mianowicie wykorzystywania specyficznych bakterii rozkładających węglowodory w procesach technologicznych. Tematyka rozprawy jest więc aktualna na tle obecnego stanu wiedzy i potrzeb inżynierii środowiska.

Ogólna charakterystyka pracy

Przedłożona do recenzji rozprawa mgr inż. Justyny Klein obejmuje 6 rozdziałów, liczy 123 strony druku, w tym 52 rysunki, 32 tabele oraz bibliografię zawierającą 119 pozycji, głównie anglojęzycznych.

Rozprawa doktorska jest podzielona na 5 zasadniczych części poprzedzonych wprowadzeniem. Po części wstępnej wprowadzającej w tematykę pracy badawczej zamieszczono informacje teoretyczne oparte na literaturze (rozdz. 2).

W tej części pracy przedstawiono:

- rozwój gazownictwa w Europie i wpływ produkcji gazu na środowisko,
- stosowane metody rekultywacji starych składowisk,
- metody usuwania węglowodorów z wód pogazowniczych.

Brakuje mi w tej części pracy dokładniejszego omówienia wpływu węglowodorów na środowisko, a w szczególności ich toksyczności na organizmy żywe. Wprawdzie nieliczne informacje na ten temat znajdują się w podrozdz. 2.1. i 2.2., lecz sądzę, że powinien być tym informacjom poświęcony osobny podrozdział. W rozdziale 3 zaprezentowano cel pracy, w którym wyszczególniono punkty dotyczące realizacji poszczególnych etapów badań. Założeniem pracy było określenie warunków niezbędnych do pozyskania ze skażonej węglowodorami gleby szczepów bakteryjnych, które mogłyby być wykorzystane następnie

w procesach oczyszczania ścieków zawierających te związki w podwyższonych stężeniach. W rozdziale tym przedstawiono także zakres pracy niezbędny do realizacji zamierzonego celu.

Warsztat badawczy przedstawiony został w rozdziale 4. W tej części pracy Autorka zamieściła informacje dotyczące stosowanych metodyk badań analitycznych i technologicznych, a także szczegółową charakterystykę użytego materiału biologicznego.

Oryginalne osiągnięcia rozprawy znalazły się w dwóch ostatnich rozdziałach: 5 i 6, w których przedstawiono wyniki badań, podsumowanie i wnioski. W pierwszym etapie badań Autorka dokonała identyfikacji mikroorganizmów wyizolowanych z wody zanieczyszczonej odpadami pogazowniczymi, wykorzystując izolację DNA, reakcje PCR i sekwencjonowanie. Następnie na podstawie badań genotypu sporządziła drzewo filogenetyczne, które w sposób schematyczny ilustruje zależności filogenetyczne pomiędzy badanymi sekwencjami i organizmami. Wykorzystując zasoby baz National Center Biotechnology Information zidentyfikowała bakterie wykazujące zdolność do biodegradacji węglowodorów. Następnym elementem badań było wyznaczenie szybkości przyrostu biomasy zidentyfikowanych szczepów bakterii. Okazało się, że wartości te są znacznie niższe niż wykazane dla bakterii heterotroficznych, rozwijających się w kłaczkach osadu czynnego, co może przyczyniać się do problemów z utrzymaniem odpowiedniej biomasy przebadanych bakterii w układach technologicznych z osadem czynnym. Podjęto również próbę oceny skuteczności oczyszczania przez wyselekcjonowane szczepy bakteryjne skażonej odpadami pogazowniczymi wody podziemnej, pobranej z terenu nieczynnej gazowni w Berlinie.

Z badań wynika, że wyższą efektywność procesu usuwania WWA uzyskiwano w hodowlach zaszczepionych mieszaniną bakterii niż pojedynczym szczepem, a także, że skuteczność oczyszczania skażonej wody przez bakterie jest indywidualną cechą danego szczepu. Cennym elementem jest włączenie do tego etapu badań testów toksyczności, gdyż wielokrotnie wskazywano, że produkty mikrobiologicznego rozkładu węglowodorów mogą być bardziej toksyczne niż sam związek wyjściowy. Uzyskane przez Autorkę opracowania wyniki wskazują, że procesy biodegradacji prowadzone przez mieszaninę szczepów bakteryjnych spowodowały obniżenie toksyczności wody skażonej WWA. Niemniej jednak wątpliwości budzi metoda wyznaczania EC_{50}. Autorka przytacza, że w próbce wody z użyciem mieszaniny bakterii po oczyszczeniu EC_{50}= 150%. Czy stężenie ścieków, odcieków może przyjmować wartość 150%?

W następnym etapie badań Doktorantka prowadziła eksperymenty mające na celu porównanie efektu usuwania dekanu, toluenu i naftalenu w wyniku biodegradacji przez szczepy

bakteryjne w obecności i bez nośnika stałego (pianka poliuretanowa). W tej części badań określono także zmiany genotypu bakterii. Wykazano, że większą skuteczność usuwania dekanu i naftalenu uzyskano przy immobilizacji komórek bakteryjnych na piance poliuretanowej, natomiast w przypadku toluenu skuteczniejsza była kultura bakterii zawieszona w roztworze.

Następna część rozprawy poświęcona jest efektom oczyszczania wody podziemnej skażonej węglowodorami i fenolem w bioreaktorze firmy Sartorius. Równolegle z badaniami biodegradacji WWA określano mutagenność wody zarówno przed, w trakcie, jak również po procesie oczyszczania. Wykazano, że produkty biologicznego rozkładu WWA nie wykazują właściwości mutagennych w stosunku do organizmu testowego. Podobny charakter miały badania biodegradacji smoły węglowej obecnej w wodzie gruntowej zanieczyszczonej węglowodorami. Doktorantka w tym etapie badań przeprowadziła 11 eksperymentów, które różniły się między sobą, obecnością lub brakiem wybranych specyficznych szczepów bakterii, bądź dodatkiem łatwo dostępnego źródła węgla w postaci glukozy, peptonu czy octanu sodu. Wykazała, że obecność bakterii, szczególnie *Rhodococcus erythropolis* korzystnie wpływał na biodegradację substancji obecnych w smole węglowej, natomiast dodatek łatwo rozkładalnego związku organicznego nie miał takiego znaczenia. Wykonane badania toksyczności testem Microtox wykazały spadek toksyczności próbek poddanych procesowi biodegradacji.

Ostatni cykl doświadczeń obejmował pomiar zużycia tlenu podczas biodegradacji wybranych węglowodorów i ich mieszanin, stanowiących jedyne źródło węgla dla szczepów bakterii. Wykonane testy respiracyjne wykazały, że bakterie z rodzaju *Pseudomonas, Stenotrophomonas i Rhodococcus* posiadają zdolności adaptacji do biologicznego rozkładu węglowodorów zarówno alifatycznych, jak i aromatycznych.

W rozdziale 6 Autorka dokonała zwięzłego podsumowania uzyskanych wyników badań oraz sformułowała zaledwie 4 wnioski wynikające z przeprowadzonych eksperymentów. Nie ma tu np. odniesienia co do skuteczności usuwania węglowodorów z badanych mediów. Ponadto, jeżeli we wnioskach podane są wartości wieku osadu, to powinny być one również zamieszczone w części opisowej np. w postaci tabeli. W pracy zabrakło mi również rozdziału (dyskusji wyników), w którym Autorka porównałaby wyniki własnych badań z dostępnymi danymi literaturowymi.

Uwagi dyskusyjne i szczegółowe

Zagłębiając się w szczegóły pracy doszukano się kilku elementów, które mogą być przedmiotem dyskusji.

1. Czym kierowała się Autorka opracowania podejmując decyzję o włączaniu testów Amensa i Microtox tylko do wybranych próbek ścieków? Nie zawsze wykazanie braku toksyczności próbki względem organizmów wodnych oznacza brak jej mutagenności. Równoczesne badanie toksyczności i mutagenności metabolitów pobiodegradacyjnych umożliwia określenie potencjalnych zagrożeń wynikających z odprowadzania ścieków do miejskiej kanalizacji lub bezpośrednio do zbiorników wodnych.
2. Co skłoniło Autorkę do formułowania wniosku na str. 73, że „przeprowadzone badania wykazały, że przy stosowaniu układów hybrydowych z wykorzystaniem biofilmów, powstających na nośnikach pływających, duże znaczenie ma wybór materiału z jakiego jest wykonany nośnik, rodzaj zanieczyszczenia oraz wiek powstającego biofilmu" gdy tymczasem Doktorantka stosowała tylko jeden nośnik (piankę poliuretanową) i nie określała przy tym wieku osadu?
3. W jaki sposób wyznaczała Doktorantka EC_{50}, uzyskując dla wody oczyszczonej wartość 150% (str. 65) ?

Uwagi redakcyjne

1. Autorka w całej pracy używa nazwy bakterii *Vibrio fisheri*, gdy powinno być *Vibrio fischeri*,
2. Str.1 w.10 g. - Jest wglowodorw, powinno być węglowodorów.
3. Str.32 - Brak w wykazie bibliograficznym cytowanej na tej stronie pozycji literaturowej (Łomonotowski i Szpindor,1999).
4. Str.42 - Dlaczego w eksperymencie 1 wprowadzano 250 cm^3 wody gruntowej, a w eksperymencie 4 i 8 ta ilość wynosiła 245 cm^3 ?
5. Str.5 - Nie do końca jestem przekonana o prawidłowości stwierdzenia „Wykorzystując zasoby baz danych NCBI ustalono, że zidentyfikowane bakterie występują w środowisku skażonym węglowodorami i charakteryzują się zdolnością do ich biodegradacji". Bazy te nie informują, że te bakterie występują w środowisku skażonym węglowodorami, jedynie ich identyfikację co do gatunku jak również zawierają dane dotyczące ich możliwości metabolicznych w tym potencjalnych możliwości biodegradacji różnych substancji. Niezasadne zatem wydaje się stwierdzenie Autorki wskazujące na przypisywanie przez

bazy NCBI zidentyfikowanych bakterii do konkretnego środowiska o danym charakterze skażenia.

6. Str.65 w.5 d. - Jest TU <10, powinno być TU >10.
7. Str.78 - Autorka powołuje się na rozdział 4.9, którego nie ma w omawianej pracy.
8. Str.100 - Brak w tabeli 32 wyników eksperymentu 10.
9. Str.114 i 115 - Spis literaturowy przedstawiony chaotycznie (bez zachowania kolejności alfabetycznej).

Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowując recenzję pracy doktorskiej mgr inż. Justyny Klein oceniam pozytywnie przeprowadzony przegląd aktualnego stanu wiedzy w zakresie problematyki poruszanej w rozprawie, jak i bogatą część doświadczalną. Uważam, że problemy prezentowane w ocenianej pracy są ważne i aktualne. Uwagi zawarte w pracy mają charakter polemiczny i w niewielkim stopniu wpływają na moją pozytywną ocenę omawianej rozprawy doktorskiej. Doktorantka wykazała się niezbędną wiedzą i umiejętnościami samodzielnego rozwiązywania postawionych przed nią trudnych zadań i problemów naukowych. Szczególnie uwagę należy zwrócić na to, że przeprowadzone badania doprowadziły do sformułowania konkretnych wniosków, które mogą znaleźć zastosowanie w praktyce.

Rozprawa doktorska mgr inż. Justyny Klein zatytułowana „Wspomaganie usuwania wybranych węglowodorów z zastosowaniem mikroorganizmów wyizolowanych ze skażonego środowiska" spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w świetle nowej ustawy o tytule i stopniach naukowych i wnoszę o dopuszczenie jej do publicznej obrony przed Radą Wydziału Inżynierii Środowiska, Geomatyki i Energetyki Politechniki Świętokrzyskiej.