



Gliwice, dnia 11/25/2016

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Arkadiusza Polewczyka
„Ozonowany olej roślinny w procesie bioremediacji środowisk naturalnych
zanieczyszczonych olejem napędowym”

1. Wprowadzenie

Recenzję wykonano na zlecenie prof. dr hab. Marii Koziółkiewicz, Dziekana Wydziału Biotechnologii i Nauk o Ziemi Politechniki Łódzkiej. Podstawą recenzji jest otrzymana 19.10.2016 rozprawa doktorska w wersji wydrukowanej oraz na nośniku CD .

2. Zasadność podjętej tematyki

Zanieczyszczenie środowiska przyrodniczego produktami naftowymi, szczególnie olejem napędowym, jest ciągle jednym z najistotniejszych problemów inżynierii środowiska. Przebadano i opracowano już wiele technologii pozwalających na skuteczne usuwanie oleju napędowego, jednak ciągle niezadawalające są ekonomiczne i ekologiczne efekty ich stosowania. Autor zaproponował i wykonał doświadczenia mające przyspieszyć, a jednocześnie uczynić mniej kosztownym, proces biologicznego usuwania oleju napędowego przez wspomaganie go dodatkiem odpadowego oleju roślinnego - czystego lub zawierającego dodatkowo ozon. Przyjął także założenie, że taki proces biodegradacji, jakkolwiek może okazać się skuteczny, to może jednak powodować określone niekorzystne skutki ekologiczne w środowisku. Postanowił więc przeprowadzić badania mające te wątpliwości wyjaśnić. Tak naszkicowany cel pracy jest zasadny i dobrze nadający się na temat pracy doktorskiej.

3. Charakterystyka pracy i uwagi do niej

Rozprawa zawiera elementy typowe dla pracy doświadczalnej. Nieco odmienny od typowego jest natomiast jej układ. Rozdział opisujący stosowaną metodykę badań (zatytułowany jako rozdział 5. Część eksperymentalna) znajduje się po opisie uzyskanych wyników (który jest rozdziałem 4. Badania własne). Zazwyczaj w publikacjach naukowych po części teoretycznej (przegląd literatury), jako pierwszy rozdział części praktycznej pojawia się punkt "materiały i metody", a potem wyniki i ich omówienie, dyskusja itd. Odejście od tej reguły w tej rozprawie wymusza wcześniejsze zapoznanie się z punktem 5, aby móc właściwie zrozumieć podane wyniki i ich omówienie zawarte w rozdziale 4. Ale po co Autor wprowadził ten mylący układ?

We wprowadzeniu (1. Wstęp) Autor w skondensowany sposób przedstawił zalety i mankamenty biologicznych procesów usuwania zanieczyszczeń oraz oczekiwania związane z wykorzystaniem dodatku olejów roślinnych do wspomagania tych procesów, a także oczekiwań jakie wiążą się z ozonowaniem tych olejów przed ich wprowadzeniem do oczyszczanego środowiska.

Część literaturowa jest obszerna (55 stron), ale nasuwa się wątpliwość czy ta obszerność jest korzystna i czy nie należało ją ograniczyć do zagadnień związanych z istotą

doktoratu. Przegląd piśmiennictwa powinien wykazać dogłębne rozeznanie przez Autora zagadnień tematyki, którą się zajął i aktualny stan wiedzy w tym zakresie. Jednakże jeżeli przegląd jest zbyt obszerny, wówczas składają się nań opisy oczywiste i „rozwadniające” istotę omawianych zagadnień. Przykładowo na stronie 45 (2-4 górny wiersz) znajduje się informacja, że „Enzymy-wielkocząsteczkowe, w większości białkowe, katalizatory przyspieszające specyficzne reakcje chemiczne poprzez obniżenie ich energii aktywacji” z powołaniem się na pozycję literaturową z 2015 roku potwierdzającą ten fakt (sic!) lub też kilka wierszy dalej informacja, że „Analizy procesu biologicznego oczyszczania środowiska naturalnego wykazały, iż każda reakcja prowadzona przez drobnoustroje jest katalizowana enzymatycznie.” To truizmy, które w takiej pracy nie powinny się znajdować, gdyż generalnie przegląd literatury powinien być krytycznym przeglądem publikacji z zakresu tematyki pracy, aby na tej podstawie uzasadnić dokonany wybór tej tematyki. Ewentualnie także usystematyzowanie znanych faktów uzasadnia zamieszczenie ich w przeglądzie literaturowym. W tym zakresie mam uwagę do zastosowanego podziału biologicznych metod oczyszczania środowiska z zanieczyszczeń ropopochodnych. W pracy podział ten jest następujący:

1. Metody biologiczne
 - 1.1. Bioremediacja
 - 1.1.1. Mikroorganizmy
 - 1.1.2. Czynniki wpływające na efekty procesu bioremediacji
 - 1.2. Biopreparaty
 - 1.2.1. Mikroorganizmy
 - 1.2.2. Enzymy
 - 1.3. Modyfikacje genetyczne
 - 1.4. Fitoremediacja

A przecież bioremediacja to wszystkie biologiczne procesy stosowane przy usuwaniu zanieczyszczeń, a więc jest określeniem nadrzędnym i obejmuje też stosowanie biopreparatów (np. bioaugmentacja, biostymulacja, stosowanie enzymów) czy też roślin (fitoremediacja). Dlatego zachowując zawarte w przeglądzie literaturowym informacje podane w wyodrębnionych punktach, bardziej zasadnym byłby podział następujący:

1. Bioremediacja (czyli metody biologiczne)
 - 1.1 . Biostymulacja (czyli czynniki wpływające na efekty bioremediacji)
 - 1.2 . Biopreparaty
 - 1.2.1. Bioaugmentacja (wzbogacenie autochtonicznymi drobnoustrojami)
 - 1.2.2. Preparaty enzymatyczne
 - 1.2.3. Drobnoustroje modyfikowane genetycznie
 - 1.3 .Fitoremediacja

Dobrze natomiast zostały przedstawione zagadnienia najistotniejsze dla tematyki doktoratu na stronach 60-68. Dotyczą one wykorzystania olejów roślinnych do wspomaganie bioremediacji. Omówiono zarówno ich rolę w bioremediacji jako ekstrahenta, właściwości składników olejów i ich działanie podobne do środków powierzchniowo czynnych, możliwość wykorzystania do produkcji biosurfaktantów, a także wytwarzania specyficznych enzymów (lakkaza) oraz ich znaczenia jako źródła węgla w kometabolicznych procesach degradacji zanieczyszczeń. Ten fragment literaturowej części doktoratu jest najbardziej frapujący i szkoda, że Autor nie rozwinął go kosztem innych mniej przydatnych informacji w części literaturowej pracy.

Rozdział „ 3. Cel i zakres pracy” zawiera dwie podstawowe hipotezy. Pierwsza zakłada, że wprowadzenie odpadowego oleju rzepakowego zwiększa efektywność usuwania produktów naftowych. Druga sugeruje, że wprowadzony do środowiska ozonowany wcześniej olej rzepakowy będzie nie tylko dodatkowym źródłem węgla i energii dla drobnoustrojów, ale

zawarty w nim ozon będzie zwiększał biodostępność zanieczyszczeń poprzez chemiczne ich utlenianie.

Podany zakres zamierzonych badań koresponduje z podanymi celami, jednakże uzasadnione byłoby dodanie doświadczeń zmierzających do określenia stężenia ozonu przy którym obserwuje się już inhibicję aktywności drobnoustrojów.

Przechodząc do rozdziału przedstawiającego i omawiającego uzyskane wyniki odnotować można, że Autor nie zauważył, iż w obecności oleju rzepakowego nastąpiła inwersja stopnia usunięcia węglowodorów przez czyste szczepy. Dotyczy to zarówno dodatku samego oleju rzepakowego, ale w szczególności wprowadzania ozonowanego oleju rzepakowego. Z wyjątkiem jednej serii doświadczeń dla najniższej wartości dodanego oleju rzepakowego (rys. 4.8.A), gdzie wielkość usunięcia węglowodorów była niższa dla szczepu *Sarcina sp. OA10* (dalej skrót OA10), we wszystkich innych była ona wyższa dla tego szczepu niż dla *Bacillus mycoides NS1020* (skrót NS1020), który w doświadczeniu bez dodatku oleju wykazywał większą aktywność w usuwaniu węglowodorów (rys. 4.3). Ten fakt może mieć także znaczenie dla zwiększonego usunięcia węglowodorów przez konsorcjum mikroorganizmów w porównaniu z doświadczeniem bez dodatku oleju rzepakowego, gdzie konsorcjum zdecydowanie gorzej usuwało węglowodory niż czyste szczepy (rys. 4.3).

Niezgodny z rzeczywistością jest komentarz do wyniku ubytku węglowodorów w próbkach z dodatkiem 1% oleju rzepakowego. Autor podaje, że „W próbach, w których zastosowano dawkę ozonu 5 mgO₃/g zanieczyszczenia (rys. 4.8 D) najwyższy ubytek węglowodorów obserwowano dla szczepu *Sarcina sp. OA10* - 38,6%, a najniższy dla konsorcjum mikroorganizmów- 14,9%” (str. 79, 1-3 dolny wiersz). Rysunek 4.8.D na który powołuje się Autor, jednoznacznie wskazuje, że najwyższy ubytek węglowodorów nastąpił dla szczepu NS1020, a dla konsorcjum i szczepu OA10 ubytki substratu były niższe. Praktycznie ubytki węglowodorów we wszystkich próbkach (oprócz kontrolnej) były takie same (w granicach od 49 do 52%). Komentarz Autora (str. 82, 5-8 górny wiersz) iż, „Wykorzystanie ozonowanego odpadowego oleju rzepakowego (10% v/v), gdzie wprowadzono 0,5 mgO₃ na 1 g zanieczyszczenia (rys. 4.11 B) lub 2 mgO₃/g zanieczyszczenia (rys. 4.10 C; powinno być 4.11C) powodowało ubytek węglowodorów podobny do prób jedynie z odpadowym olejem rzepakowym (10% v/v; rys. 4.11 A)”, należałoby uzupełnić informacją, że były to jednak wartości zdecydowanie wyższe niż dla próbek z 5% dodatkiem oleju rzepakowego (rys. 4.9).

Generalnie z analizy ubytku węglowodorów przedstawionych na rysunkach 4.8, 4.9, 4.11 i 4.12 wynika, że dla danego substratu (olej napędowy) w stężeniu 10% w środowisku wodnym uzyskuje się takie same efekty jego ubytku (>50%) przy dodatku 10% oleju rzepakowego i obecności czystych szczepów lub ich konsorcjum (rys. 4.11), jak przy wyłącznym stosowaniu ozonowanego oleju rzepakowego przy stężeniu ozonu 5 mgO₃/g_{sm} zanieczyszczenia (rys. 4.12). Rysunek 4.8 wykazuje bowiem, że dodatek samego 1% oleju rzepakowego lub ozonowanego oleju rzepakowego przy stężeniu O₃ do 5 mg/ g_{sm} nie wpływa znacznie na efektywność procesu. Jedynie dodanie oleju rzepakowego z ozonem w stężeniu 5 mgO₃/g_{sm} powoduje 50% usunięcie węglowodorów. Nieco lepsze wyniki uzyskuje się dla wprowadzenia 5% oleju rzepakowego, natomiast praktycznie identyczne usunięcie węglowodorów (50%) dopiero dla wszystkich prób z 10% dodatkiem oleju rzepakowego (rys. 4.11). Natomiast wyniki procesu bez wprowadzania drobnoustrojów, ale jedynie z dodatkiem ozonowanego oleju rzepakowego wykazują (rys. 4.1 D), że wówczas proces chemiczny przy stężeniu 5mgO₃ /g_{sm} powoduje taki sam efekt, to jest 50% usunięcie węglowodorów.

Powyższe wnioski korespondują z konkluzjami Autora, który stwierdza (str. 83, 6-8 górny wiersz), że „Efektywność procesu degradacji oleju napędowego, do którego wykorzystano jedynie ozonowany olej rzepakowy, była analogiczna do prób, gdzie wykorzystano jedynie wyselekcjonowane szczepy bakterii.”. Warto byłoby jednak

przeprowadzić doświadczenia, które wykazałyby przy jakim stężeniu ozonu zachodzą już wyłącznie procesy chemicznego utleniania badanego substratu olejowego, gdyż biologiczne uległy całkowitemu lub częściowemu zahamowaniu pod wpływem wytworzonych wolnych rodników/ozonu.

Ciekawe są rezultaty pomiaru zmian odczynu w czasie biodegradacji w środowisku wodnym (p. 4.3.1.2). Inaczej niż Autor można interpretować fakt zmniejszenia, a potem zwiększenia pH. Autor sugeruje, że ten końcowy wzrost pH jest wywołany przez produkty uboczne powstające w końcowej fazie degradacji węglowodorów (str. 87, 3-6 górny wiersz). Bardziej wiarygodną przyczyną może być po prostu zanik (rozkład) tych półproduktów, które wcześniej powodowały obniżenie odczynu. Także zmiany odczynu pod wpływem ozonowanego oleju rzepakowego bez udziału mikroorganizmów można nieco inaczej wytłumaczyć. Autor podaje (str. 96 ostatni akapit przed punktem 4.3.1.3), że „Taki przebieg prawdopodobnie może wskazywać, że ozon rozpuszczony w odpadowym oleju rzepakowym, przechodzi do fazy wodnej i generuje bardzo reaktywne rodniki hydroksylowe, co zwiększa stężenie jonów wodorowych”. Bardziej prawdopodobna jest interpretacja taka, że powstające bardzo aktywne rodniki hydroksylowe powodują chemiczny rozkład składników oleju napędowego, a półprodukty tego rozkładu są kwaśne. O takich konsekwencjach przemian oleju napędowego zarówno podczas biodegradacji, jak również pod wpływem czynników chemicznych pisze sam Autor. Uzyskane wyniki są na tyle obszerne i ciekawe, że może warto pokusić się o ich wykorzystanie do opisu kinetyki biodegradacji oleju napędowego wspomaganą chemicznymi procesami.

Logiczne są konkluzje w podsumowaniu doświadczeń nad usuwaniem oleju napędowego w środowisku wodnym, ale trzeci wniosek należy zmodyfikować. Otóż sam autor wykazał, że nie jest zasadne jednoczesne stosowanie procesu mikrobiologicznego i chemicznego. Na str.83 (5-7 górny wiersz) podaje, że „Efektywność procesu degradacji oleju napędowego, do którego wykorzystano jedynie ozonowany olej rzepakowy, była analogiczna do prób, gdzie wykorzystano jedynie wyselekcjonowane szczepy bakterii.”, a dalej (8-11 wiersz) „Tym samym chemiczne usuwanie węglowodorów, w badanych warunkach, wydaje się być dobrą alternatywą jeżeli niemożliwym jest wprowadzenie do środowiska wodnego mikroorganizmów wykazujących preferencje substratowe do węglowodorów.”. Czyli dodatek samego odpadowego oleju rzepakowego i odpowiednio dobrane stężenie zaadaptowanych drobnoustrojów daje efekty równe stosowaniu ozonowanego oleju rzepakowego, a jedynie w przypadku braku zaadaptowanych drobnoustrojów warto stosować dodatek ozonowanego oleju rzepakowego (lub samego ozonu, co należałoby przebadać). Natomiast równoczesne stosowanie obydwu procesów powodujących podobny efekt jest nieuzasadnione, komplikuje jedynie proces i podraża go. Równoczesne stosowanie procesu biologicznego i chemicznego może być zasadne wówczas, gdy proces chemiczny o intensywności nie wpływającej na aktywność drobnoustrojów powoduje wzrost biodostępności substratu, a proces biologiczny kontynuuje destrukcję oleju napędowego. Także ostatnie stwierdzenie w podsumowaniu (str. 107), że „ozon rozpuszczony w odpadowym oleju rzepakowym pomimo silnych właściwości dezynfekujących nie był czynnikiem bójącym i nie hamował wzrostu mikroorganizmów w badanych próbach” wymaga uzupełnienia, gdyż do potwierdzenia jego prawdziwości brak dowodu wprost. Wyniki przemian oleju napędowego pod wpływem samego ozonu (rys. 4.12) uzasadniają podejrzenie, że usuwanie oleju napędowego spowodowane jest głównie procesami chemicznymi, a drobnoustroje w małym stopniu są aktywne w obecności zastosowanych stężeń O₃.

Analiza ubytku oleju napędowego w środowisku gruntowym potwierdza jednoznacznie zwiększenie efektywności procesu po wprowadzeniu do środowiska czystych szczepów OA10 i NS1020 o ponad 10% (rys. 4.23 A), odpadowego oleju rzepakowego o ponad 50% w zależności od dawki oleju rzepakowego (rys. 4.23 B i C), a najbardziej po

wprowadzeniu ozonowanego oleju rzepakowego do końcowego stopnia usunięcia wynoszącego około 97% po 56 dniach inkubacji zarówno dla próbek z samymi szczepami bakteryjnymi, jak również z mieszaniną obydwu szczepów. (rys. 4.23 D).

Interesujące wyniki uzyskano dla pomiarów aktywności dehydrogenaz. Aktywność ta w próbkach z olejem napędowym i dodatkiem oleju rzepakowego była zawsze niższa niż w próbkach z samym olejem napędowym, co odbiega od oczekiwań, że aktywność dehydrogenaz będzie miarą intensywności procesu rozkładu substratu, więc powinna być wyższa w próbach gdzie notowano wyższy ubytek węglowodorów(próby z dodatkiem oleju rzepakowego) . Możliwą przyczyną tego może być powstawanie w czasie bioremediacji toksycznych produktów końcowych, co nie potwierdzają wyniki analiz chemicznych, gdzie widać jednoznaczne i wysokie zmniejszenie zawartości poszczególnych składników oleju napędowego z wyjątkiem estru metylowego kwasu olejowego (rys. 4.24 i 4.25). W tej sytuacji efekt toksyczny powodujący zmniejszenie aktywności dehydrogenaz wywołany może być tym pozostałym składnikiem o wysokim stężeniu (rys. 4.25) lub też tym, iż dominującymi dla uzyskanego wysokiego usunięcia węglowodorów były procesy chemiczne spowodowane działaniem ozonu, który jednak także hamował aktywność dehydrogenaz. O tym, że taki efekt toksyczny w środowisku glebowym wystąpił świadczą pomiary fitotoksyczności. Wykazują one, że w miarę zwiększania stężenia dodanego oleju rzepakowego wzrasta fitotoksyczność środowiska glebowego (rys. 4.31 A, 4.32 A, 4.33 A), ale również wzrastające dawki ozonu (w oleju rzepakowym) powodują wzrost fitotoksyczności (rys. 4.31 BCD, 4.32 B C D i 4.33 B C D). Aby ustalić prawdziwość którejs z wymienionych sugestii, należałoby wyznaczyć toksyczność estru metylowego kwasu olejowego.

Wnioski zawarte w podsumowaniu (str. 139) są logiczne i potwierdzają korzystny wpływ dodatku oleju rzepakowego (także poddanego wcześniej ozonowaniu) na efektywność procesu usuwania oleju napędowego prowadzonego przez wyselekcjonowane szczepy bakterii OA10 i NS1020 lub ich mieszaninę. Jednocześnie zasadna jest także konkluzja Autora, że dla osiągnięcia pełnej rewitalizacji gruntów wskazane są dalsze zabiegi np. obróbka agrotechniczna.

Rozdział 5 nazwany częścią eksperymentalną, zawiera opis stosowanych materiałów i metod wykorzystywanych podczas badań.

Lakoniczne wnioski zawarte w części 6 są słuszne i potwierdzają, że Autor zrealizował cele jakie postawił sobie na początku pracy doktorskiej.

Rozdział 7 jest obszerny i zawiera około 260 pozycji literatury potwierdzając wszechstronne rozeznanie literatury tematyki doktoratu. Jest to piśmiennictwo aktualne, bo zaledwie 14 pozycji ukazało się przez 2000 rokiem, natomiast znaczna ich liczba, bo 30 z nich pochodzi z ostatnich 3 lat.

W pracy zauważono błędy redakcyjne, które zaznaczone zostały bezpośrednio w recenzowanym maszynopisie. Spośród nieco istotniejszych mankamentów wymienić można:

Str.25. 2-3 dolny wiersz. Autor podaje „Dotychczas nie poznano szczepów bakterii zdolnych do degradacji metanu w warunkach beztlenowych”. Nie jest to prawda. Taką umiejętność posiadają metanotrofy. Metan może być utleniony w środowiskach beztlenowych przez wybrane konsorcja archeonów i bakterii redukujących siarkę (w formie przypuszczenia wspomina też o tym Autor). Beztlenowe metanotrofy nie należą do tych samych bakterii, co znane tlenowe metanotrofy.

Str. 55, 3-5 wiersz w punkcie 2.4.2.3. Autor bezkrytycznie pisze o nanocząsteczkach, że „Związki te są łagodne dla środowiska, nie ingerują w naturalną jego równowagę, toteż znajdują zastosowanie do rekultywacji środowisk skażonych różnego rodzaju związkami chemicznymi, w tym ropopochodnymi.”, ale zaprzecza temu twierdzeniu na stronie następnej (6-9 górny wiersz), gdzie stwierdza, iż „W przypadku stosowania nanocząsteczek istnieje obawa, iż związki znajdujące się w środowisku naturalnym po zakończonych procesach

rekultywacji, mogą uwalniać do otoczenia szkodliwe komponenty o negatywnym oddziaływaniu zarówno na otoczenie jak i człowieka”.

Str. 56 do 59. Występuje zła numeracja poszczególnych punktów pracy np. na stronie 59 istnieje punkt 2.4.3.1, który powtarza się na stronie 59. A między tymi stronami pojawia się dziwna numeracja punktów (4.12, 4.13, 4.14, 1.1.6 i 1.1.7)

Str. 82, 7 górny wiersz. Jest rysunek 4.10 C; ma być rys. 4.11.C

Str. 122, 2 dolny wiersz. Jest punkt 4.2.7.2.1; ma być 5.2.7.2.1

Str. 142, 1 dolny wiersz. Jest punkt 4.1.3.1 nie występujący w całej pracy; ma chyba być 5.1.4.1 C

Str. 148, 3-5 górny wiersz. Autor podaje „TTC zastępuje w analizie tlen i wszystkie inne naturalnie występujące akceptory elektronów i protonów, odłączane przez dehydrogenazy od utlenianych związków organicznych”. To niezbyt dokładnie tak. TTC może być końcowym akceptorem elektronów i protonów w łańcuchu oddechowym tych dehydrogenaz, których potencjał oksydoredukcyjny ich naturalnego końcowego akceptora elektronów i protonów jest wyższy niż TTC (a więc także tlen). Jest jednak wiele beztlenowych drobnoustrojów, których końcowy akceptor elektronów i protonów posiada niższy potencjał redoks niż TTC i związek ten nie może stać się akceptorem elektronów i protonów. W takim przypadku do pomiaru aktywności dehydrogenaz należy stosować inną sól tetrazoliową o niższym potencjale redoks niż ich końcowy naturalny akceptor np. INT.

Wymienione powyżej uwagi mają na celu wskazanie niewykorzystane przez Autora możliwości, jakie wynikać mogą z innych niż autorskie interpretacje uzyskanych wyników, a także stanowić sugestie dalszych doświadczeń zwiększających wszechstronność proponowanej przez Autora technologii bioremediacji. Generalnie rozprawę uważam za ciekawą i cenną, a jej osąd jest jednoznacznie pozytywny.

4. Wniosek końcowy

W oparciu o przedstawioną rozprawę stwierdzam, że Autor trafnie wytypował tematykę badawczą, jasno sformułował cel pracy, właściwie zaplanował i wykonał doświadczenia, wykazał się umiejętnością interpretacji i dyskusji wyników badań oraz wyciągania właściwych wniosków. W konsekwencji stwierdzam, że Pan mgr inż Arkadiusz Polewczyk swoją rozprawą ujawnił uzdolnienie do samodzielnego prowadzenia badań naukowych, a przedstawiona rozprawa rozszerza wiedzę w zakresie procesów bioremediacji środowiska wodnego i glebowego (gruntowego) zanieczyszczonego olejem napędowym. Proponowany i przebadany do tego celu proces z wykorzystaniem dodatku odpadowego oleju rzepakowego lub ozonowanej jego postaci, jest innowacyjną technologią. Rozprawa ta spełnia więc wymagania ustawy o tytule naukowym i stopniach naukowych, a w szczególności art.13. ustawy z dnia 14.03 2003 oraz odpowiada wymaganiom §5 Rozporządzenia Ministra Edukacji Narodowej i Sportu z dnia 15.01.2004. Stawiam więc wniosek o dopuszczenie Pana Arkadiusza Polewczyka do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

