



Gliwice, dnia 2015-12-18

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Doroty Wieczorek
„Mikrobiologiczna degradacja biodiesla w warunkach tlenowych”**

1. Zasadność podjętej tematyki

Istotnym składnikiem biogospodarki jest produkcja biopaliw, z których obok etanolu najważniejszym jest biodiesel. Wzrost produkcji biopaliw powoduje także określone konsekwencje środowiskowe. Istnieje więc potrzeba badań nad losami biopaliw przedostających się do środowiska oraz wpływem ich tam obecności na elementy tego środowiska. Dotychczas opublikowane prace dostarczają częstokroć odmiennych informacji. W części z nich sugeruje się wyższą biodegradowalność i mniejszą toksyczność czystego biodiesla i jego mieszaniny z tradycyjnym olejem napędowym. W innych konkluzje do jakich dochodzą autorzy są odmienne. To zróżnicowanie uzyskiwanych wyników, wywołane jest zapewne wieloma czynnikami – składem biopaliw, warunkami środowiskowymi, wykorzystywanymi drobnoustrojami. Doktorantka postawiła sobie za cel pozyskanie mikroorganizmów wykazujących się zdolnością do degradacji w warunkach tlenowych biodiesla (estry metylowe kwasów tłuszczowych FAME) oraz jego mieszanin z olejem napędowym, a także przebadanie ekologicznych skutków tych procesów. Cel ten uznać należy za zasadny i godny pracy doktorskiej.

2. Charakterystyka pracy i uwagi do niej

Praca posiada charakter typowy dla prac eksperymentalnych. W krótkim wstępie Doktorantka przedstawiła „filozofię” doktoratu i wymieniła zamiary, jakie zamierza zrealizować w pracy. Dość obszerny przegląd literatury (52 strony) przedstawia rodzaj biopaliw, a w szczególności biodiesla – otrzymywanie, skład, właściwości, perspektywy produkcji biopaliw, a także ekotoksykologiczne konsekwencje ich rozpowszechnienia. Odrębny podpunkt w tym rozdziale poświęcono dodatkowi występującym w biodieslu, co uzasadnione jest tym, iż znaczna część przeprowadzonych badań obejmuje ocenę wpływu tych dodatków na właściwości paliw, a także skutki ekotoksykologiczne wywołane ich obecnością w paliwie. Dalej omówiono biodegradację biopaliw ze szczególnym uwzględnieniem czynników wpływających na ten proces. Przedstawiono także wpływ produktów pośrednich biodegradacji biodiesla na mikroorganizmy. O ile ten punkt zawierał informację dotyczące zarówno drożdży, jak również bakterii, to niezrozumiałe jest wyodrębnienie osobnego podpunktu poświęconego wyłącznie mechanizmom odpowiedzi drożdży na stres środowiskowy.

Po przeglądzie literaturowym przedstawiono cel oraz zakres zamierzonych badań. Cel został lakonicznie, ale jednoznacznie i precyzyjnie przedstawiony, a zadania wymienione w zakresie zamierzonych doświadczeń korespondują z tym celem i uzasadniają oczekiwania, że cel ten zostanie zrealizowany.

160

Do rozdziału „Materiały i metody” mam dwie uwagi. Pierwsza dotyczy podpunktu 4.2.7.2. „Oznaczenia aktywności dehydrogenaz” (str. 77). Autorka wykorzystuje metodykę opracowaną przez Casida w 1964 roku nie podając wszakże źródła literaturowego tej metodyki. Autorka podaje także, że metoda ta została przez nią zmodyfikowana poprzez wydłużenie czasu inkubacji do 20 godzin. Nie podaje powodów tej modyfikacji, ale jej konsekwencją jest przyjęcie dziwacznej jednostki aktywności dehydrogenaz, a mianowicie $\mu\text{mTPF/gsm} \cdot 20\text{h}$. Zazwyczaj jednostka w której występuje czas pojawia się on jako godzina, minuta lub sekunda, a nie ich krotność. Chcąc być konsekwentną Autorka powinna w jednostkach aktywności respiracyjnej podać w mianowniku okres wykonywania pomiaru, a nie minutę. Ten zabieg powoduje także, iż nie można bezpośrednio porównywać uzyskanych przez Autorkę wyników oznaczeń z wynikami innych autorów.

Inna uwaga związana z pomiarami aktywności dehydrogenaz dotyczy przyjętego sposobu jej wyznaczania. W opisie występuje pewien chaos. Na stronie 72 (5 dolny wiersz) Autorka podaje, że próbą kontrolną była gleba bez zanieczyszczenia, dalej podaje, że próbą odniesienia była gleba bez mikroorganizmów, poddana sterylizacji, natomiast w opisie wzoru do obliczenia aktywności dehydrogenaz podaje: „c – jest to odczyt dla próby kontrolnej bez TTC”. Nie podano natomiast czy stosowano próbę odniesienia w której znajdowałby się gleba i TTC, ale bez zanieczyszczenia. Różnica między aktywnością dehydrogenaz w próbie z biodieslem i próbie bez biopaliwa pozwalałaby ocenić wpływ zanieczyszczenia (biodiesla) na dynamikę procesów samooczyszczania.

Inna uwaga dotyczy zamieszczonego schematu badań na nienumerowanej stronie maszynopisu (pomiędzy 81 a 82 stroną). Jest to bardzo zasadny schemat ukazujący sekwencję prowadzonych doświadczeń, a także ich rozległość. Jednakże uwidacznia on także pewien ich mankament dotyczący oznaczenia aktywności enzymatycznych. Występuje tutaj niekonsekwencja w poszczególnych etapach badań. Na etapie izolacji i selekcji mikroorganizmów oznaczono jedynie aktywność esteraz; w etapie badania wpływu składu substratów i jego stężenia na biodegradację stosowano pomiar aktywności esteraz oraz aktywności respiracyjnej dla wody i aktywności esteraz oraz dehydrogenaz dla gleby, natomiast dla etapu wyznaczenia wpływu obecności przeciwutleniaczy, H_2O_2 , WKT i metanolu dla cieczy oznaczano aktywność esteraz i respiracyjną, a dla gleby jeszcze dodatkowo aktywność katalazy. Ujmując sprawę tabelarycznie wygląda to następująco:

Etap badań		Aktywność esteraz	Aktywność respiracyjna	Aktywność dehydrogenaz	Aktywność katalazy
Izolacja i selekcja		TAK			
Wpływ substratu	Woda	TAK	TAK		
	Gleba	TAK		TAK	
Wpływ H_2O_2 , WKT	Woda	TAK	TAK		
	Gleba	TAK	TAK		TAK

O ile zrozumiałe jest ograniczenie oznaczeń aktywności enzymatycznych na etapie izolacji i selekcji drobnoustrojów do pomiaru aktywności esteraz, to niekonsekwencja stosowanych pomiarów aktywności w dalszych etapach stwarza wrażenie przypadkowości ich wyboru.

Szkoda także, że niekonsekwencje w prowadzeniu poszczególnych badań ograniczają możliwości interpretacyjne uzyskanych wyników. Przykładowo w rozdziale „Wyniki” na stronie 86 (ostatni ustęp) Autorka podaje, że najwyższą

efektywność procesu uzyskano dla mieszanin B10 i B20 oraz dla czystego ON, kiedy biodegradację prowadzono z udziałem *C. methanosorboza* (tablica 16). Być może jednak równie wysokie wyniki dla ON uzyskano by *C. alkanivolans*, ale próby z ON dla tego szczepu nie były przeprowadzone. Powyższe przypuszczenie potwierdzone jest wynikami uzyskanymi w kolejnych badaniach z zawartością 8% substratu w podłożu. Widać, że dla szczepu *D. subtilis* stopień usunięcia był znacznie wyższy dla ON niż dla mieszanin B10, B20 i B30, co sugeruje, że szczepy bakterii lepiej radziły sobie z ON niż z FAME. W tym ostatnim doświadczeniu z 8% zawartością FAME ciekawa jest inwersja wyników ubytku poszczególnych węglowodorów C₁₂-C₁₈ i sumy FAME. Poszczególne węglowodory, były lepiej usuwane niż FAME dla B20, ale dla B10 było odwrotnie. Fakt ten opisała sama doktorantka (strona 88, 3 -10 dolny wiersz), ale ciekawy byłby komentarz tego zjawiska.

Znaczna część badań związana była z wyznaczeniem aktywności enzymatycznych biodiesla i ON w środowisku wodnym i glebowym. To bardziej ciekawe i cenne pomiary, jednak ich interpretacja sprawia trudności (także innym autorom). Przykładowo na stronie 117 Autorka podaje, że „w procesie biodegradacji biodiesla z udziałem szczepu *C. methanosorboza* lub *B. subtilis* aktywność enzymów była wyższa niż pozostałych próbach” i komentuje ten fakt tym, że „proces degradacji mógł przebiegać wolniej, w związku z czym wyższa (była) aktywność esteraz”. Dlaczego wyższa aktywność enzymów ma świadczyć o wolniejszym przebiegu biodegradacji? Na tej samej stronie autorka podaje też (przełom stron 117 i 118), że „aktywność esteraz w obecności (przeciwutleniacza PG) była wysoka ...powiązane to mogło być z utrudnionym dostępem enzymu do substratu”. Dlaczego utrudniony dostęp miałyby zwiększać aktywność enzymów?

Bardzo dobrym zamysłem były pomiary aktywności dehydrogenaz oraz szybkości pobierania tlenu podczas biodegradacji biodiesla (punkt 5.4 str. 126). Użyteczność pomiarów aktywności enzymatycznych do śledzenia procesów biodegradację jest stale podkreślana w wielu badaniach, ale często uzyskiwane wyniki są trudne w interpretacji i odbiegają od oczekiwań. Szansą na sprawdzenie ich przydatności były doświadczenie tak zaplanowane jak w tytule podpunktu „5.4. Aktywność dehydrogenaz oraz szybkość pobierania tlenu w zależności od ilości WKT”. Albowiem w przypadku biodegradacji estrów metylowych kwasów tłuszczowych należało oczekiwać współzależności pomiędzy oznaczeniami aktywności esteraz, dehydrogenaz i respiracyjnej. Wynika to z faktu, że w przypadku takiego jednolitego substratu rozpoczęcie metabolizmu zależy od aktywności esteraz, a potem losy powstałych kwasów tłuszczowych związane są z aktywnością dehydrogenaz utleniających je w procesie β -oksydacji i w cyklu Krebsa, natomiast produkty tych dwóch szlaków są z kolei substratem dla łańcucha oddechowego, gdzie końcowym akceptorem elektronów jest tlen. Można więc było zasadnie oczekiwać, współzależności pomiędzy wartościami aktywnościami tych trzech grup enzymów. Szkoda więc, że zapowiadane w punkcie 5.4 zamiary nie udało się zrealizować przez prosty fakt, iż dla pomiarów w glebie przewidziano oznaczenie aktywności respiracyjnej bez pomiarów aktywności dehydrogenaz, a dla biodegradacji w środowisku wodnym odwrotnie. Tym niemniej przynajmniej część tych oczekiwań można było zrealizować, gdyż w obydwu środowiskach wyznaczano aktywność esteraz. Jednak w dyskusji wyników nie wyznaczano/omawiano współzależności pomiędzy wynikami oznaczanej aktywności poszczególnych enzymów. A szkoda. Można było sądzić, że oczekiwania te zrealizowane będą w rozdziale obejmującym dyskusję wyników. Niestety, tak się nie stało.

Generalnie recenzent odczuwa pewien niedosyt związany z dyskusją wyników badań. Rozdział ten jest obszerny, ale w znacznej części stanowi omówienie doświadczeń wykonywanych w poszczególnych etapach pracy. Jak ciekawe, ale nie do końca wykorzystane są wyniki przeprowadzonych doświadczeń, chciałbym przedstawić na jednym tylko przykładzie. W dyskusji na stronie 145 autorka stwierdza (3-6 górny wiersz), że „prowadząc biodegradację z udziałem bakterii niezależnie od wyjściowego stężenia w środowisku wodnym niemal w każdym doświadczeniu zaobserwowano negatywny wpływ dodatku biokomponentu do ON na efektywność procesu”. A tłumaczy ten fakt tym, że (6-11 górny wiersz) „może to wskazywać, że stosowane szczepy bakterii doskonale sobie radziły z rozkładem ON, natomiast wprowadzenie do środowiska łatwo przyswajalnego źródła węgla (FAME) zahamowało syntezę enzymów potrzebnych w przyswajaniu węglowodorowych substratów”. Takiej interpretacji przeczą jednak wyniki uzyskane dla czystego biodiesla, gdzie widać, że usunięcie FAME przez bakterie, szczególnie w stężeniach 12% (rysunek 3 i 4 w załączniku str. 8), jest niskie. Więc przyczyna takich wyników rozkładu mieszanin biodiesla i ON jest bardziej złożona, a może po prostu wynikać też z tego, iż składnikiem trudno rozkładalnym przez bakterie w tej mieszaninie jest właśnie FAME, a nie ON. Autorka jednak uparcie trwa przy tej interpretacji gdyż na tej samej stronie 145 powołując się na inne krajowe publikacje podaje, że „łatwo dostępny biodiesel zamiast stymulowania rozkładu węglowodorów na zasadzie kometabolizmu, może wywołać nadmierny wzrost pewnej grupy autochtonicznych mikroorganizmów, co utrudnia wzrost pozostałym mikroorganizmom. Zjawisko to może się przyczynić do pogarszania degradacji frakcji naftowej w mieszaninie diesel/biodiesel”. Szkoda, że tezy tej autorka nie dowiodła, a można to było dość łatwo uczynić. Wystarczyło prowadzić dłużej proces i rejestrować ubytek substratów, a pomiary aktywności enzymatycznej w tym wydłużonym okresie ujawniłyby zmiany w dynamice zachodzących procesów. Pomiary te ujawniłyby czy rzeczywiście następuje sukcesja wykorzystania substratów w mieszaninie diesel/biodiesel, i w pierwszej kolejności wykorzystywane są przez bakterie FAME, a potem ON. Na to, że biodiesel był trudno przyswajalnym substratem lub hamującym biodegradację wskazują zresztą wyniki uzyskane przez samą Autorkę na stronie 148 (4-8 górny wiersz), gdzie podaje ona, że „najwyższą aktywność dehydrogenaz wykazano podczas bioremediacji gleby zawierającej ON. Wprowadzenie do ON większej ilości biokomponentu (B20, B30) powodowało obniżenie aktywności dehydrogenaz zarówno dla drożdży, jak i bakterii”. Gdyby FAME było łatwiej przyswajalnym substratem, to aktywność dehydrogenaz powinna wzrosnąć, a nie zmaleć. Jednak innym przypuszczalnym mechanizmem zmniejszenia efektywności biodegradacji biodiesla może być to, że powstające w pierwszym etapie biodegradacji kwasy tłuszczowe mają własności toksyczne i mogą negatywnie wpływać na efektywność mikrobiologicznej degradacji biodiesla. Taki efekt zauważyła Autorka w innym miejscu dyskusji (strona 150, 8-13 górny wiersz), ale nie wykorzystwała ten fakt jako jedną z przypuszczalnych przyczyn negatywnego wpływu biodiesla na rozkład jego samego i w mieszaninie z ON. Wymienione wyżej uwagi recenzenta mają na celu wykazanie, jak wiele ciekawych wyników uzyskała Doktorantka, jednak nie zostały one satysfakcjonująco wykorzystane.

Recenzent odczuwa więc pewien niedosyt związany z dyskusją badań. Niedosyt ten dotyczy jednak jedynie interpretacji uzyskanych wyników i ich powiązań z badaniami innych autorów, a nie jej obszerności; wydaje się nawet, iż dyskusja zyskałaby gdyby była bardziej zwięzła. Natomiast trafnie przedstawione zostały wnioski z przeprowadzonych badań. Wnioski te potwierdzają jednocześnie, że autorka osiągnęła cele, jakie postawiła sobie podejmując badania.

Wykaz literatury jest obszerny (ponad 300 pozycji w większości anglojęzycznej) i potwierdza, że autorka dobrze rozeznała aktualny stan tematyki, którą zajmowała się w swojej pracy.

3. Walory poznawcze pracy

Oprócz stwierdzeń, jakie zawarte są we wnioskach pracy, za szczególnie istotne uważam następujące osiągnięcia Autorki:

- 1) Stwierdzenie, że spośród wykorzystanych do badań mikroorganizmów drożdże (*C. methanosorboza*) preferowały jako źródło węgla estry metylowe kwasów tlenowych FAME, natomiast dla bakterii był to ON (str. 90-91),
- 2) Udowodnienie, że ilości uwalnianych do środowiska (woda i gleba) wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) są ściśle powiązane z szybkością procesów biodegradacji biopaliw, więc analiza stężeń WKT może stanowić dobre narzędzie oceny intensywności ich degradacji (str. 109-110),
- 3) Stwierdzenie, że wraz ze zwiększającą się ilością FAME w glebie i postępowaniem biodegradacji stosowanych biopaliw wzrastała fitotoksyczność w glebie (str. 113), a wzrost ten jest znacznie wyższy niż podczas bioremediacji gleby zanieczyszczonej olejem napędowym ON (nawet o 74% str.111),
- 4) Ustalenie, że spośród półproduktów metabolizmu bardziej niekorzystnie na procesy biodegradacji wpływają WKT niż metanol, co potwierdzają także pomiary aktywności katalaz będące miernikiem stresu oksydacyjnego mikroorganizmów (str. 138-139),
- 5) Jednoznaczne wykazanie, że spośród przebadanych drobnoustrojów organizmy eukariotyczne (drożdże *C. methanosorboza* DB13) wykazały się wyższą uniwersalnością metabolizmu i możliwościami adaptacyjnymi do zmian w środowisku niż organizmy prokariotyczne (bakterie *G. alkanovorans* S7, *A. xylosoxidans* G21, *B.subtilis* P31).

4. Wniosek końcowy

W oparciu o przedstawioną rozprawę stwierdzam, że Autorka trafnie wytypowała tematykę badawczą, jasno sformułowała cel pracy, właściwie zaplanowała i wykonała doświadczenia, wykazała się umiejętnością interpretacji wyników badań oraz wyciągania właściwych wniosków. W konsekwencji stwierdzam, że Pani mgr inż Dorota Wieczorek swoją rozprawą ujawniła uzdolnienie do samodzielnego prowadzenia badań naukowych, a przedstawiona rozprawa rozszerza wiedzę w zakresie procesów mikrobiologicznego rozkładu estrów metylowych kwasów tłuszczowych (biodiesel) oraz oleju napędowego. 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 r. Stawiam więc wniosek o dopuszczenie Pani Doroty Wieczorek do publicznej obrony rozprawy doktorskiej

