

Gdańsk 10 kwietnia 2022 r.

Prof. dr hab. inż. Hanna Obarska-Pempkowiak, prof. zw. PG
Politechnika Gdańska
Wydział Inżynierii Lądowej i Środowiska
ul. G. Narutowicza 11/12
80-233 Gdańsk

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr **Bożeny Fenert** pt. „Studies of novel micromethods for determination of various micropollutants and biomarkers in selected environmental and/or technological processes related to surface water ecosystems and wastewater treatment.”

1. Podstawa recenzji

Formalną podstawą recenzji jest pismo Pani Rektor Dr hab. Danuty Zawadzkiej, prof. PK z dn. 7 lutego 2022 r. informujące mnie, że Uchwałą nr 3/2022 Senatu Politechniki Koszalińskiej, podjętą w dniu 26 stycznia 2022 roku, zostałam powołana na recenzenta rozprawy doktorskiej przygotowanej przez mgr Bożenę Fenert.

2. Umieszczenie tematyki badawczej

Temat rozprawy doktorskiej został trafnie wybrany. Wpisuje się w najnowsze trendy badań w obszarze dyscypliny *inżynierii środowiska, górnictwa i energetyki*. Mikrozanieczyszczenia organiczne (tzw. ksenobiotyki) są emitowane do środowiska wodnego w wyniku licznych działań podejmowanych przez człowieka. Dotychczas nie są monitorowane w komunalnych oczyszczalniach ścieków i nie znajdują się w obowiązujących wymogach dotyczących jakości oczyszczonych ścieków odprowadzanych do odbiorników. Są traktowane jako niebezpieczne związki dla środowiska, ponieważ są trwałe i odporne na utlenianie. Wiele z nich ma zdolność do biokoncentracji (bioakumulacji) oraz do biomagnifikacji w łańcuchu pokarmowym. W konsekwencji następuje przekazywanie substancji szkodliwych w górę łańcucha pokarmowego, gdzie ich stężenia, mogą zwiększać się nawet o współczynnik wynoszący wiele tysięcy. Wiele z nich jest zawsze w jakimś stopniu szkodliwa dla środowiska i człowieka. W organizmach żywych mogą tworzyć się metabolity. Często metabolity powstające podczas rozkładu niektórych ksenobiotyków są bardziej szkodliwe niż związki wyjściowe.

Recenzowana rozprawa doktorska ma na celu wykazanie na podstawie wstępnych badań wskaźnikowych w różnych próbkach pochodzących: z wodnych ekosystemów i ścieków po kolejnych procesach stosowanych w komunalnych oczyszczalniach, że można przeprowadzić analizę ilościową niektórych ksenobiotyków i biomarkerów warunkach *in situ* za pomocą zminiaturyzowanych metod detekcji umożliwiających szybkie i tanie ich określenie.

Podstawę podjętego tematu rozprawy stanowią dwa podejścia analityczne: tzw. celowana i nie-celowana analiza mikrozanieczyszczeń i biomarkerów wyizolowanych z wody (ang. target analysis; non-target analysis).

Badania prowadzono z wykorzystaniem nowych metod analitycznych, do oznaczenia barwników chlorofilowych oraz niskocząsteczkowych związków organicznych. W tym celu stosowano celulozę, celulozę modyfikowaną n-alkanami oraz filamenty puchu mniszka lekarskiego – jako matryce do adsorpcji mikrozanieczyszczeń i biomarkerów z wodnych ekosystemów. Po raz pierwszy opisano szereg procedur analitycznych umożliwiających rozdzielanie analitów przy użyciu technik mikroplanarnych (typu NP.: Normal Phase oraz RP: Revers Phase. Zastosowane procedury umożliwiły Doktorantce porównanie i klasyfikację wodnych ekosystemów oraz wykazanie, że jest możliwe zaadoptowanie do użytku w celach detekcji przenośnych urządzeń analitycznych, takich jak aparaty fotograficzne w telefonach komórkowych. Proponowane rozwiązanie jest nie tylko korzystne pod względem ekonomicznym, lecz również spełnia cele gospodarki cyrkulacyjnej, ponieważ eliminuje stosowanie dotychczas prezentowanego w analizie ilościowej podejścia: ekstrakcja/separacja/detekcja przy użyciu spektrometrii masowej oraz umożliwia proste przeprowadzenie oceny jakości środowiska i oczyszczanych ścieków bez użycia środków chemicznych. Prezentowana tematyka stanowi odpowiedź na Dyrektywy Europejskie dotyczące substancji priorytetowych, które zostały wyszczególnione w *The European Union Water Framework Directive 2000/60*.

3. Ocena pracy

Oceniana rozprawa doktorska ma formę opracowanego maszynopisu liczącego 52 strony tekstu oraz dodatkowo zawiera 189 pozycji cytowanego piśmiennictwa, 7 dyrektyw, 5 rozpraw doktorskich, 7 odsyłaczy internetowych oraz listę 20 artykułów własnych będących rezultatem przeglądu najnowszych doniesień literatury i badań własnych prezentowanych w rozprawie. Ponadto w pracy znajduje się 7 tabel oraz 31 rysunków, 2 streszczenia w języku polskim i angielskim. Praca została podzielona na 13 rozdziałów. Rozdział 1 liczący 25 stron został podzielony na 7 podrozdziałów i stanowi syntetyczny przegląd literatury podzielony na następujące podrozdziały: *1.1 Key problems overview tj. Przegląd kluczowych problemów*, *1.2 General problems of micropollutants based on the European Union Water Framework Directive – odnoszący się do zagadnień związanych z mikrozanieczyszczeniami analizowanymi w Europejskiej Ramowej Dyrektywie Wodnej*, *1.3 Selected micropollutants and biomarkers in various aquatic ecosystem – odnoszący się do wybranych mikrozanieczyszczeń i biomarkerów w różnych wodnych ekosystemach*, *1.4 Cyanobacteria as source of biomarkers and micropollutants – Cyjanobakterie, jako źródło biomarkerów i mikrozanieczyszczeń*, *1.5 Algae as a bioindicators – dotyczącej doniesień literaturowych wskazujących, że glony mogą być traktowane jako bioindykatory*. *1.6 Technological processes related to sewage treatment – odnoszący się do analizy procesów związanych z oczyszczaniem ścieków komunalnych oraz podrozdział 1.7 Advances in microanalytical devices, tj. dotyczący zagadnień związanych ewaluacją nowych metod pomiarowych związanych z analizą ilościową mikrozanieczyszczeń*. W rozdziale 2 *Main aims of the PhD thesis* sformułowano cele i tezy pracy. W rozdziale 3 zatytułowanym *Experimental part* tj. *Części eksperymentalnej* znajdują się trzy podrozdziały związane z *3.1 Reagents and solution*,

poświęcony *Reagentom i roztworom* stosowanym w analizie ilościowej, 3.2 *Stationary phases*, poświęcony *Nieruchomym fazom*, 3.3 *Biological materials - Biologicznym materiałom*, 3.4 *Equipment* - podano sprzęt wykorzystywany w prowadzonych badaniach oraz podrozdział 3.5 *Data post-processing and computation*, gdzie podano w jaki sposób *Przetwarzano dane i wykonywano obliczenia*. W rozdziale 4. *Results and Discussion* podano uzyskane *Wyniki i ich omówienie* z podziałem na dwa podrozdziały 4.1 *Proposal of fast fingerprinting of different types of water samples based on various analytical approaches* tj. *Propozycji szybkich metod detekcji różnych próbek wody na podstawie analitycznych procedur* oraz podrozdział 4.2 *Determination of target micropollutants and biomarkers in selected surface waters and wastewaters samples using elaborated micro-TPL protocol* tj. *Okeślenie mikrozanieczyszczeń i biomarkerów w wybranych próbkach wód powierzchniowych i ścieków z zastosowaniem metody rozdziału i detekcji micro-TLC*. W rozdziale 5. *Conclusions* podano *Wnioski* a kolejne rozdziały stanowią: rozdział 6 *Spis tabel*, rozdział 7 *Spis rysunków*, rozdział 8 *Spis literatury*, rozdział 9 *Lista artykułów*, w których Doktorantka była współautorem oraz rozdział 10 *Abbreviations* – stanowiący *Wykaz stosowanych skrótów i pojęć*, rozdział 11 i 12 *Streszczenie w języku angielskim i polskim* oraz rozdział 13 *Supplements list*.

Strukturę pracy uważam za kompletną a podział na poszczególne rozdziały jest logiczny. W przytoczonym *Spisie literatury* znajdują się wyłącznie pozycje anglojęzyczne, co świadczy o dobrym rozeznanii Doktorantki w przedmiocie badań. W przeglądzie literatury w rozdziale 1 przeprowadzono syntetyczny przegląd związany z najnowszą wiedzą dotyczącą wybranych grup mikrozanieczyszczeń i biomarkerów w środowisku wód naturalnych a także przeprowadzono analizę procesów związanych z oczyszczaniem ścieków komunalnych. Na końcu przeglądu zaprezentowano najnowszą wiedzę związaną z ewolucją metod pomiarowych związanych z analizą ilościową mikrozanieczyszczeń. *Przegląd teoretyczny* stanowi wartościową część pracy. Został trafnie skomponowany i w sposób przejrzysty udokumentowano w nim zagadnienia związane z tematyką pracy.

Autorka przyjęła ambitne tezy pracy:

1. Na podstawie wstępnych badań wskaźnikowych oraz obliczeniach statystycznych, (w szczególności analizie głównych składowych Principal Component Analysis - PCA). w różnych próbkach pobieranych z wodnych ekosystemów można w warunkach in-situ przeprowadzić wybór/ analizę mikrozanieczyszczeń i biomarkerów.
2. Jest możliwe zastosowanie celulozy i celulozy modyfikowanej n-alkanami oraz filamentów puchu mniszka lekarskiego – jako matryc do adsorpcji mikrozanieczyszczeń i biomarkerów z próbek pochodzących z wodnych ekosystemów. Te materiały były wybrane do niecelowej analizy (non-target analiz) odnoszącej się do kilkunastu grup substancji chemicznych o niskocząsteczkowej masie charakteryzujących się wysoką i średnią polarnością.
3. Określenie i optymalizacja nowych i szybkich, (ograniczających zużycie roztworów organicznych) procedur mikroseparacji: micro – TLC i micro – HPTLC (termostat and high – performance micro – thin – layer chromatography) do rozdzielania i analizy ilościowej barwników z materiałów biologicznych i w próbkach pobranych z wodnych ekosystemów.

4. Można określić ilościowo rozdzielane barwniki chlorofilowe za pomocą opracowanej procedury polegającej na adsorpcji analitów na wybranych biopolimerach oraz klasyczną ekstrakcją do fazy stałej. Analizę ilościową można przeprowadzić stosując rozdzielanie micro-TLC analitów, pomiar fluorescencji plamek na mikropłytkach i analizę uzyskanych danych korzystając z procedury statystyki wielowariacyjnej (analizy czynnikowej PCA)
5. Zastosowanie nowego ilościowego narzędzia przede wszystkim do przeprowadzenia ekstrakcji celulozy i filamentów puchu mniszka lekarskiego w celu uzyskania matryc do adsorpcji mikrozanieczyszczeń i biomarkerów z próbek pochodzących wodnych ekosystemów: jezior, rzek z Pomorza Środkowego oraz z Morza Bałtyckiego w rejonie Kołobrzegu i Bornholmu.
6. Testowanie potencjalnych zastosowań ilościowych procedur, na podstawie fluorescencji plamek, do oceny ilościowej biomarkerów i mikrozanieczyszczeń w różnych próbkach pobieranych z: wodnych ekosystemów i ścieków po kolejnych etapach oczyszczania. Uzyskane wyniki będą stanowić wstępną bazę do projektowania i wdrażania analitycznych procedur w celu potwierdzenia możliwości przeprowadzenia szybkiej kontroli na obecność mikrozanieczyszczeń.

Udowodnienie tez wymagało:

- zaprezentowania dwóch nowych podejść analitycznych: tzn. celowaną i niecelowaną analizę mikrozanieczyszczeń i biomarkerów z wyizolowanych próbek wody (ang. Target analysis i non-target analysis),
- zaadoptowania nowych metod analitycznych wykorzystywanych w analizie barwników chlorofilowych i niskocząsteczkowych związków, przy użyciu selektywnych adsorbentów i przyjaznych środowisku biopolimerów,
- określenie możliwości wykorzystania celulozy i celulozy modyfikowanej n-alkanami oraz filamentów puchu mniszka lekarskiego, jako matryc do adsorpcji mikrozanieczyszczeń i biomarkerów z próbek pobieranych z wodnych ekosystemów,
- przeprowadzenia testowania celulozy jako fazy stacjonarnej do frakcjonowania badanych związków,
- przeprowadzenia optymalizacji rozdzielania i analizy ilościowej barwników chlorofilowych, w próbach środowiskowych oraz materiałach biologicznych (komórki spiruliny i tkanki liści szpinaku)
- przeprowadzenia analizy wybranych parametrów fizyczno-chemicznych oraz analizę profili chromatograficznych szeregu próbek wodnych pobieranych z jezior Pomorza Środkowego oraz Morza Bałtyckiego okolic portu Kołobrzeg i Bornholmu
- przeprowadzenia analizy chromatogramów dla próbek ścieków komunalnych pobieranych po kolejnych etapach oczyszczania w Oczyszczalni „Jamno”,
- analizę ilości rozdzielonych barwników chlorofilowych w pobranych próbkach wodnych i ścieków na podstawie opracowanej procedury: adsorpcji analitów na stosowanych w badaniach biopolimerach oraz klasycznej ekstrakcji do fazy stałej (SPE: Solid Phase Extraction).

Badania przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych korzystając m.in. z następujących urządzeń:

Multiparametr Waterproof Mater firmy Hanna Instruments, Termostated micro-TLC chamber, Digital camera (Canon EOS i UV filter) Xiaomi smartphone, Centrifuge MPW-Solid-phase extraction (SPE) chamber, Vacuum pump, Oil Vacuum pump, Thermo Savant, Vacuum centrifuge Savant, mikroskopu optycznego i mikroskopu elektronowego JEDL .

Przyjęty zakres i metodyka badań są prawidłowe i nie budzą zastrzeżeń. Doktorantka w sposób przejrzysty udokumentowała przyjęty harmonogram i procedury badań. Zastosowane metody badań są nowoczesne i właściwie dobrane, umożliwiają kompleksową ocenę i nie budzą zastrzeżeń pod względem merytorycznym. Po raz pierwszy w rozprawie opisano szereg nowych procedur analitycznych dotyczących rozdzielania analitów przy użyciu technik mikroplanowych (typu NP.: Normal Phase, oraz RP: Revers Phase. Jako związki modelowe wybrano barwniki chlorofilowe, ze względu na łatwość ich rozdzielania i detekcji metodą micro-TLC, jak również na ich potencjalną zdolność do kompleksowania i przenoszenia mikrozanieczyszczeń w wodnych ekosystemach. Wykazano, że analiza ilościowa tych związków umożliwia porównywanie i klasyfikację wodnych ekosystemów. W pobranych próbkach z ekosystemów wodnych i ścieków przeprowadzono analizę ilościową rozdzielonych barwników chlorofilowych. Do tego celu wykorzystano opracowane procedury: adsorpcję analitów na badanych biopolimerach oraz klasyczną ekstrakcję do fazy stałej (SPE: Solid Phase Extraction). Analiza ilościowa polegała na: rozdzieleniu mikro-TLC analitów, pomiarze fluorescencji plamek na mikroplamkach i przeprowadzeniu analizy uzyskanych wyników korzystając z procedur statystyki wielowariancyjnej (analizy czynnikowej PCA – Principal Component Analysis). Na podstawie przeprowadzonej oceny ilościowej wykazano, że podczas procesu oczyszczania ścieków komunalnych w *Oczyszczalni Jamno* wytwarzana jest znacząca ilość barwników chlorofilowych. Substancje te przedostają się do odbiorników (wód powierzchniowych) wraz z odprowadzanymi ściekami, w ilości o rząd wielkości większej niż ich typowa zawartość w wodach powierzchniowych. W pracy podano również wyniki porównawcze zawartości barwników chlorofilowych w różnych wodnych ekosystemach . Zaproponowana w rozprawie doktorskiej metodyka badań umożliwia zaadoptowanie w celach detekcji przenośnych urządzeń analitycznych, takich jak aparaty fotograficzne w telefonach komórkowych. Uzyskane wyniki wstępnie potwierdziły możliwość szybkiego monitorowania zawartości pojawiających się mikrozanieczyszczeń podczas realizacji kolejnych etapów oczyszczania ścieków. Jest to bardzo istotne, ponieważ z powodu globalnego ocieplenia wody powierzchniowe stają się potencjalnym źródłem mikrobiologicznych toksyn, np. za sprawą cyjanobakterii. Dodatkowo oprócz toksyn, szereg substancji organicznych jest wydzielanych przez organizmy żywe. Substancje te mogą być toksyczne, a dodatkowo mogą być potencjalnym nośnikiem mikrozanieczyszczeń. Taką grupą związków mogą być biopolimery - jak barwniki chlorofilowe. Z tego powodu zostały wybrane jako przedmiot analiz niniejszej rozprawy.

Mam pytanie, czy Doktorantka mogłaby mi odpowiedzieć jakie działania powinny być podejmowane w komunalnych oczyszczalniach ścieków, aby ograniczyć dopływ tych mikrozanieczyszczeń odprowadzanych do środowiska wraz z oczyszczonymi ściekami.

4. Uwagi szczegółowe

- Tytuł rozprawy jest za długi, ponieważ zawiera zbyt dużo szczegółowych informacji. Niektóre z nich mogą być podane w rozdziale „*Introduction*” lub „*Main aims of PhD*”
- W streszczeniu w języku polskim znajduje się nieprawidłowy zapis „*ściek oczyszczony*” zamiast „*ścieki oczyszczone*”.

5. Walory poznawcze pracy

Za istotne dokonania rozprawy uważam:

- wykazanie, że zaproponowana procedura analityczna polegająca: na adsorpcji analitów na badanych biopolimerach oraz klasyczna ekstrakcja do fazy stałej (Solid Phase Extraction: SPE), a następnie rozdział micro-TLC analitów połączony z pomiarem fluorescencji plamek na mikropłytkach oraz zastosowana analiza czynnikowa PCA umożliwiła wykonanie oceny ilościowej barwników chlorofilowych w oczyszczonych ściekach i badanych wodnych ekosystemach,
- wykazanie, że zaadoptowanie w celach detekcji przenośnych urządzeń analitycznych takich jak aparaty fotograficzne w telefonach komórkowych mogą być wykorzystane do wykonywania tanich i szybkich analiz ilościowych mikrozanieczyszczeń w różnych wodnych ekosystemach i ściekach komunalnych po kolejnych etapach oczyszczania.

6. Wniosek końcowy

Zasugerowane nieliczne zastrzeżenia nie ujmuje bardzo pozytywnego odbioru rozprawy. Oceniana rozprawa prezentuje ambitny program badań. Został przyjęty szeroki zakres badań laboratoryjnych w ramach analizy ilościowej mikrozanieczyszczeń i biomarkerów w licznych próbkach wód powierzchniowych, stanowiących odbiorniki dla oczyszczonych ścieków oraz próbek ścieków po kolejnych etapach oczyszczania stosowanych w procesie oczyszczania ścieków komunalnych.

Uzyskane wyniki analiz umożliwiły przeprowadzenie oceny ilościowej uzyskanych wyników na podstawie analizy czynnikowej (PCA). Stanowiły one podstawę do wdrożenia, innowacyjnej, szybkiej i taniej metody analitycznej polegającej na użyciu aparatów fotograficznych w telefonach komórkowych do detekcji mikrozanieczyszczeń i biomarkerów oraz barwników chlorofilowych w wodnych ekosystemach a także w ściekach. Doktorantka prezentuje wysoki poziom wiedzy związanej z realizacją najnowszych badań analitycznych oraz z wykorzystaniem narzędzi matematycznych do oceny statystycznej otrzymanych wyników.

Podsumowując moją recenzję stwierdzam, że oceniana rozprawa mgr Bożeny Fenert spełnia wymagania ustawy art. 30 z dn. 14 marca 2003 roku stawiane rozprawom doktorskim.

Biorąc pod uwagę zakres przeprowadzonych badań, udowodnienie ambitnych tez pracy i opracowanie nowoczesnej, innowacyjnej metodologii związanej z wdrożeniem i wykonaniem wstępnych badań z zastosowaniem mikrometod w analizie mikrozanieczyszczeń i biomarkerów, wnioskuję o wyróżnienie. Zaprezentowane podejście ma nie tylko walory poznawcze, ale również użytkowe, ponieważ stanowi skuteczne, szybkie narzędzie w monitorowaniu mikrozanieczyszczeń: uwalnianych do ścieków podczas oczyszczania oraz

obecnych w wodach powierzchniowych stanowiących odbiorniki dla odprowadzanych ścieków.

Dodatkowo chciałabym nadmienić, że mgr Bożena Fenert w latach 2014-2021 brała udział jako współautor w opracowaniu wyników badań w 9 recenzowanych artykułach naukowych związanych z dyscypliną inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka. Wg bazy Scopus h-indeks wynosi 3 a liczba cytowań opublikowanych prac wynosi 13. Oznacza to, że prowadzone przez Doktorantkę badania naukowe jak i ich efekty cieszą się zainteresowaniem w kraju i za granicą.

J. Opatowska - Tempkonik