

Dr hab. Magda Caban, prof. UG
Katedra Analizy Środowiska
Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański

04.04.2022 r. Gdańsk

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani 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 ecosystem and wastewater treatment”

promotor pracy: Dr hab. Paweł K. Zarzycki prof. PK

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Bożeny Fenert została wykonana w Wydziale Inżynierii Lądowej, Środowiska i Geodezji Politechniki Koszalińskiej pod kierunkiem dr. hab. Pawła Zarzyckiego, prof. PK. Przedmiotem rozprawy są zagadnienia z tematu nowych zminiaturyzowanych metod oznaczania zanieczyszczeń środowiska i biomarkerów w próbkach środowiskowych. Stopień doktora ma być nadany w dziedzinie Nauk Inżynieryjno-Technicznych, w dyscyplinie Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka.

Nowoczesne metody analityczne bazują na wieloetapowych procedurach z wykorzystaniem zaawansowanych narzędzi, typu wysokosprawna chromatografia i spektrometry mas. Dzięki temu otrzymuje się wynik dokładny i precyzyjny, jeśli tylko walidacja została odpowiednio przeprowadzona. Metody takie służą oznaczaniu śladowych zanieczyszczeń w próbkach pochodzenia środowiskowego, w żywności czy próbkach biologicznych. Na takie analizy jest zapotrzebowanie w związku z koniecznością badania coraz to mniejszych stężeń, gdyż podejrzewamy, że niemal każde zanieczyszczenie antropogeniczne ostatecznie trafi do matrycy wcześniej wspomnianych. Potrzeba wykonywania tego typu analiz wiąże się z dużym kosztem pozyskania informacji. Ponadto otrzymuje się informacje co do zawartości wybranych przedstawicieli śladowych zanieczyszczeń, często bez wiedzy o głównych składnikach, mogących pełnić funkcje biomarkerów i wносить wiele cennych danych do scharakteryzowania badanego

środowiska. Wynika to m.in. z faktu, że zaawansowane metody nie dadzą informacji o analitach na bardzo różnym poziomie stężeń. Stąd istnieje trend opracowywania metod tzw. zminiaturyzowanych (ang. *micromethods*), które ograniczają etap przygotowania próbki i koszt analizy, natomiast zwiększają szybkość uzyskania wyników, które są może mniej precyzyjne i dokładne, ale mogą scharakteryzować dane środowisko bardziej kompleksowo i dzięki analizie statystycznej ocenić jego jakość w porównaniu to innych podobnych danych. W ramach tego trendu powstała recenzowana rozprawa doktorska.

Rozprawa doktorska nie posiada jednego głównego celu badawczego i nie postawiono hipotezy badawczej co jest wymagane z pracach eksperymentalnych. Na stronach 31-32 (rozdział 2 pt. „*Main aims of the PhD Thesis*”) znajdują się opisane 6 celów pracy, które bardziej odpowiadają zadaniom badawczym wykonanym przez Panią mgr. Bożenę Fenert. Nie będę tu przytaczać każdego z nich, ale skrótowo można nakreślić, że dotyczą testowania nowego naturalnego materiału adsorpcyjnego do niecelowej ekstrakcji analitów o charakterze średniopolarnym i polarnym, optymalizację micro-HPTLC do rozdzieleń chlorofili, porównanie dwóch trybów detekcji fluorescencyjnej analiz chlorofili i flawonoidów z matryc wodnych środowiskowych, wykorzystanie opracowanej metody do analiz próbek wody powierzchniowej i próbek ścieków. W tej części nie zgadza się, ze stwierdzeniem, że analizowane zostały mikrozanieczyszczenia, skoro wyniki przedstawiono dla chlorofili, naturalnych składników ekosystemu o właściwościach lipofilowych.

Kandydatka jest autorem dziewięciu publikacji, przy czym rozprawa doktorska napisana w języku angielskim bazuje na sześciu publikacjach. W Tabeli 1 znajduje się ich podsumowanie.

1. Publikacje przedstawione jako podstawa rozprawy doktorskiej

Nr.	Publikacja	Typ	Cytowanie na stronie
1	Zarzycki P.K., Fenert B., Głód B.K., Cyclodextrins based nanocomplexes for encapsulation of bioactive compounds in food, cosmetics and pharmaceutical products: principles of supramolecular complexes formation, their influence on the antioxidative properties of target chemicals and recent advances in selected industrial applications. Encapsulations Book Series: Nanotechnology in the Agri-Food Industry 2 (2016) 717-767	Publikacja przeglądowa	Nie znalazłam cytowanie Zarzycki 2016a

2	Zarzycki P.K., Kaleniecka A., Fenert B. , Hopanoids in Cyanobacteria. Biomass and Related Samples.; Studies in Natural Products Chemistry: Chapter 3 Book Series, Volume: 48 (2017) 87-107.	Publikacja przeglądowa	17, 18, 20 (wstęp teoretyczny)
3	Pereira J.C., Marques J.M.C., Włodarczyk E., Fenert B., Zarzycki P.K. , Toward the Understanding of Micro-TLC Behavior of Various Dyes on Silica and Cellulose Stationary Phases Using a Data Mining Approach Journal of AOAC International 10:5, (2018) 1437-144.	Publikacja eksperymentalna	9, 16 (wstęp teoretyczny)
4	Zarzycki P. K, Świdarska-Dąbrowska R., Piaskowski K., Lewandowska L., Fenert B., Mitura K.A., Baran M.J. , Carbon-based and Related Nanomaterials as Active Media for Analytical, Biomedical, and Wastewater Processing Applications Edited By Pawel K. Zarzycki Chapter 14 ,2 (2020) by CRC Press.	Publikacja przeglądowa	9, 15 (wstęp teoretyczny)
5	Zarzycki P.K. Lewandowska L, Fenert B., Piaskowski K., Kobaka J. , Investigation of hybrid methods for elimination of Brilliant Blue dye from water phase using various nanomaterials combined with activated sludge and duckweed. Nanomaterials,11(7), (2021)1747.	Publikacja eksperymentalna	9 (wstęp teoretyczny)
6	Zarzycki P.K., Piaskowski K., Lewandowska L, Fenert B. K., Świdarska-Dąbrowska R., Ślęczka-Wilk M., Pereira J.C. , Portable micro-planar extraction, separation and quantification devices for bioanalytical and environmental engineering applications. Elsevier book chapter 8 (2022) 163.	Publikacja eksperymentalna	Wielokrotnie w części wynikowej

Należy zaznaczyć, że w części wynikowej cytowana i opisywana jest tylko jedna publikacja z cyklu (Zarzycki, 2022), a więc można uznać, że rozprawa doktorska w całości bazuje na tej pracy eksperymentalnej. Pani mgr B. Fenert nie jest pierwszym autorem tej publikacji i nie można ocenić jaki jest jej udział w jej napisaniu. W trakcie procesu recenzji poprosiłam o dodatkowe oświadczenia współautorów, lecz nie wynika z nich jaka część powstałych publikacji jest dziełem Kandydatki a jaka innych sześciu współautorów. W publikacji, która stanowi właściwie podstawę przedstawionej rozprawy doktorskiej Kandydatka powinna mieć udział znaczący, nie jest to jednak dobrze udokumentowane. Inne prace eksperymentalne (numer 3 i 5 w Tabeli 1) są cytowane tylko w części teoretycznej, a więc nie są podstawą pracy eksperymentalnej pracy i nie powinny zostać włączone do cyklu. Wyniki przedstawione w tych dwóch publikacjach nie są w żaden sposób opisane w części wynikowej i nie odpowiadają na cele pracy. Ponadto, wszystkie pozostałe prace z cyklu (numer 1, 2 i 4) są cytowane tylko we wstępie teoretycznym i nie są stanowią cyklu z publikacją nr 6, gdyż

przedstawiają inne zagadnienia badawcze. Publikacja numer 1 nie jest w ogóle zacytowana w rozprawie. Podsumowując, Pani mgr B. Fenert przedstawiła cykl sześciu publikacji, ale tylko jedna publikacja eksperymentalna jest podstawą rozprawy doktorskiej. Reszta publikacji powinna zostać potraktowana jako publikacje uzupełniające.

Praca rozpoczyna się od jednostronicowego wstępu, który opisuje wyzwania aktualnej chemii analitycznej, takie jak potrzeba opracowywania szybkich metod do detekcji mikrozanieczyszczeń w próbkach technologicznych na przykładzie ścieków. Następnie 22 strony części teoretycznej są poświęcone zagadnieniom:

- mikrozanieczyszczenia według dyrektywy wodnej,
- wybrane mikrozanieczyszczenia i biomarkery w ekosystemie wodnym: środki higieny osobistej, związki zaburzające gospodarkę hormonalną, farmaceutyki, naturalne i sztuczne barwniki, małowcząsteczkowe związki na przykładzie triterpenoidów,
- cyjanobakterie jako źródło biomarkerów i mikrozanieczyszczeń,
- glony jako bioindykatory (pół strony),
- procesy technologiczne w oczyszczalni ścieków,
- postępy w dziedzinie miro-urządzeń analitycznych.

Po tym następuje rozdział *Główne cele rozprawy doktorskiej* (2 strony). Następnie przedstawiona jest część eksperymentalna (3,5 strony), gdzie opisano rozpuszczalniki organiczne, wzorce wewnętrzne, fazy stacjonarne, materiał biologiczny (dmuchawce mniszka, szpinak, rzęsa wodna), aparatura, opis sposobu obróbki statystycznej wyników.

Kolejnym rozdziałem jest część wynikowa, która bez rysunków i tabel to 11,5 strony, a więc połowa objętości tekstu, która znajduje się we wstępie teoretycznym, co w pracy eksperymentalnej nie jest prawidłowe.

Poniżej znajduje się opis siedmiu Tabel i trzydziestu jeden Rysunków, które przedstawiono w pracy z komentarzami.

Tabela 2. Opis tabel przedstawionych w rozprawie doktorskiej

Część teoretyczna	
Table 1	Opracowanie własne na podstawie dyrektywy
Table 2	Zapóżycone spoza cyklu
Table 3	Opracowanie własne – przegląd technologii
Część wynikowa	
Table 4	Opracowanie własne – parametry fizykochemiczne wody
Table 5	Opracowanie własne, nieopublikowane
Table 6	Opracowanie własne – przegląd metodyk – powinno się znaleźć w części literaturowej
Table 7 części A-D	Opracowanie zapóżycone Ślaczka 2013 i Ślaczka-Wilk 201, B. Fenert nie jest współautorem

Tabela 3. Opis rysunków przedstawionych w rozprawie doktorskiej

Część teoretyczna	
Fig 1	Bibliometria własna
Fig 2	Bibliometria własna
Fig 3	Cykl - Zarzycki 2022
Fig 4	Zapóżycone spoza cyklu
Fig 5	Zapóżycone spoza cyklu
Fig 6	Zapóżycone spoza cyklu
Część eksperymentalna	
Fig 7	<i>Zdjęcie własne</i>
Fig 8	<i>Zdjęcie własne</i>
Część wynikowa	
Fig 31	Zarzycki 2022, ale robione przez prof. Pereira
Figure 9	Cykl - Zarzycki 2022
Fig. 10	Opracowanie własne
Fig. 11	Cykl - Zarzycki 2022
Fig. 12	Opracowanie własne
Fig. 13	<i>Zdjęcie własne</i>
Fig. 14	<i>Zdjęcie własne</i>
Fig. 15	<i>Schemat, który powinien się znaleźć w części eksperymentalnej</i>
Fig. 16	Cykl - Zarzycki 2022
Fig. 17	Zdjęcie zapóżycone spoza cyklu
Fig. 18	Cykl - Zarzycki 2022, część praca L.L.
Fig. 19	Cykl - Zarzycki 2022
Fig. 20	Cykl - Zarzycki 2022, część praca L.L.
Fig. 21	Cykl - Zarzycki 2022
Fig. 22	Cykl - Zarzycki 2022
Fig. 23	Cykl - Zarzycki 2022
Fig. 24	Cykl - Zarzycki 2022
Fig. 25	Cykl - Zarzycki 2022
Fig. 26	<i>Zdjęcie własne – powinno być w części eksperymentalnej</i>
Fig. 27	Cykl - Zarzycki 2022
Fig. 28	Cykl - Zarzycki 2022, część praca L.L.
Fig. 29	Cykl - Zarzycki 2022

Fig. 30	Cykl - Zarzycki 2022
Fig. 31 (powyżej)	Cykl - Zarzycki 2022 – wykonane przez Pereira

Jeśli chodzi o tabele, to w części teoretycznej znajdują się jedna będąca opracowaniem własnym. W części wynikowej są dwie takie tabele. Tabela 6, przedstawiająca przegląd metodyk powinna znaleźć się w części teoretycznej. Natomiast Tabela 7 jest zapożyczona z publikacji, w której mgr B. Fenert nie jest autorem.

Jeśli chodzi o rysunki to w części teoretycznej jest ich sześć, przy czym dwa przedstawiają bibliometrię, jedna jest z cyklu publikacji, trzy zapożyczone spoza cyklu. W części eksperymentalnej są dwa zdjęcia. W części wynikowej są 23 rysunki, przy czym:

- 2 to zdjęcia własne,
- 2 opracowania własne nieopublikowane,
- 16 to rysunki zapożyczone z publikacji z cyklu (Zarzycki 2022), z których w części jest autorem Pani L. Lewandowska oraz jeden rysunek (nr 31) autorstwa Pereira i inni.

Część zdjęć (Rysunki nr 13, 14, 17, 25, 26, 27) powinna znaleźć się w części eksperymentalnej. Można więc było ograniczyć się w części wynikowej do ok. 20 rysunków z 31 zamieszczonych.

Rysunek 15 ewidentnie przedstawia schemat postępowania z próbkami i powinien się znaleźć w części eksperymentalnej. Jest też niejasno przedstawiony – co oznacza „extraction (100 uL)”? Woda pobierana jest jako próbka chwilowa, próbki do oznaczeń chlorofilu są z różnych źródeł, natomiast próbki zbierały próbki uśrednione w czasie 0,5-1 godziny. Jasne jest, że umieszczanie na tym schemacie próbek szpinaku i spiruliny jest niewłaściwe, skoro nie były pobrane ze środowiska. Jakie więc wspólne wyniki można w ten sposób osiągnąć? Schemat kończy się przecież na słowie „Conclusions”. Nie zaznaczono, czy używano systemu micro-TLC oraz że detekcja była fluorescencyjna. Nie jest też jasne co oznacza „storage extraction solvent” i co się działo pomiędzy „absorbing material” i „UV-Vis detection”, a więc brakuje „bloków” z tym schemacie postępowania z próbkami środowiskowymi, a które warto by opisać pokrótce w części eksperymentalnej.

W sekcji wynikowej opisano następujące wyniki:

- A. analizę parametrów fizykochemicznych (temperatura, pH, przewodnictwo, zawartość tlenu rozpuszczonego, potencjał redox) zbiorników powierzchniowych używając technik statystycznych. Wydaje się, że takie analizy mają niewielką nowość naukową. Wyników nie porównano z literaturą.
- B. użycie przenośnego (ang. *portable*) urządzenia z biopolimerem (celuloza i celuloza modyfikowana alkanami) jako sorbent do oznaczeń chlorofili w wodzie środowiskowej z detekcją spektrofotometryczną lub fluorescencją, dla którego zaproponowano w przyszłości użycie do szybkiej charakteryzacji środowiska wodnego telefonami komórkowymi.
- C. mikrochromatografię TLC chlorofili ekstraktów spiruliny i rzęsy wodnej – dobór fazy ruchomej i stacjonarnej (Rysunek 20) – mikro-TLC chlorofili nie jest nowością naukową, gdyż było wielokrotnie już przedstawiane w publikacjach naukowych.
- D. optymalizację detekcji chlorofili rozdzielonych techniką mikro-TLC i zbadanie granicy oznaczalności a właściwie porównanie detekcji UV-Vis z fluorescencją.
- E. testowanie nowych materiałów sorpcyjnych do analizy związków rozpuszczonych w wodzie, tj. celulozy, celulozy zaimpregnowanej n-alkanami i materiał z dmuchawca mniszka, następnie analiza frakcji wymytej alkoholem za pomocą mikro-TLC. Badania ciekawe, lecz obarczone kilkoma błędnymi założeniami, które przedstawiam w dalszej części.
- F. oznaczanie mikrozanieczyszczeń i biomarkerów w wybranych wodach powierzchniowych i ściekach z użyciem mikro-TLC. W założeniu miała to być analiza ilościowa i jakościowa. Próbkę ekstrahowano techniką SPE. Ostatecznie analizę przeprowadzono tylko dla chlorofilów. Analizę wykonano dla próbek pobranych z różnych głębokości jeziora Drawsko. Stwierdzono małe stężenie związków małocząsteczkowych w tym akwenie, ale należy mieć na uwadze, że detekcje zrobiono tylko na chlorofile, a więc rzeczywiste stężenie wszystkich związków małocząsteczkowych jest najprawdopodobniej znacznie większe. Tabele 7B i 7C dotyczące oznaczeń w ściekach nie posiadają cytowani, natomiast są powiązane z Rysunkami S7 i S8, które z kolei są spoza cyklu. Powstaje więc pytanie czy w temacie pracy powinna się znaleźć informacja o analizie próbek ścieków. Nie jest też jasne czy Pani mgr B. Fenert robiła obliczenia chemometryczne samodzielnie. Ponadto opracowana metoda analizy chlorofili nie została porównana do innych, przykładowo w kwestii konsumpcji rozpuszczalników, co ułatwiło by ocenę opracowanego rozwiązania.

Podsumowanie zajmuje 3,5 strony i nie podsumowuje wyników części eksperymentalnej, ale także opisuje część teoretyczną, co nie jest zgodne z konwencją pracy eksperymentalnej. Część teoretyczna powinna być tak skonstruowana aby była użyteczna w dyskusji wyników. Natomiast w tym przypadku zawiera wiele niepowiązanych informacji. Przykładowo – skoro celem pracy nie była ocena usuwania zanieczyszczeń w oczyszczalni ścieków, rozdział dotyczący technologii usuwania w oczyszczalni ścieków nie był konieczny. Podobnie, analitami nie były leki i EDCs, więc nie było potrzeby ich przedstawiać w części teoretycznej.

W pracy o objętości 52 stron tekstu zacytowano ponad 210 publikacji, przy czym, co uważam za duży minus, w części wynikowej znajduje się cytowanie tylko trzech obcych publikacji. Widać więc, że nie porównano wyników z innymi dostępnymi pracami a więc nie podano wad i zalet proponowanych rozwiązań. Wykaz skrótów powinien znaleźć się na początku pracy, co ułatwiłoby korzystanie z niego.

Mam kilka innych zastrzeżeń merytorycznych do pracy:

- Pani mgr B. Fenert nie jest autorem konstrukcji do detekcji przedstawionej na Rysunku 14 (jest nim dr hab. P. Zarzycki, prof. PK), a jedynie jej użytkownikiem. Czy więc cała praca wpisuje się w dziedzinę Nauk Inżynieryjno-Technicznych?
- Z jednej strony stwierdzono, że próbnik zawierający biopolimer wyłapuje tylko związki niskocząsteczkowe, z drugiej strony, że także mikroorganizmy. Nie widzę przeszkody, żeby związki wysokocząsteczkowe nie mogły być także sorbowane.
- Nie zgadzam się ze stwierdzeniem, że „Using this non-expensive and simple tool it is possible to quantify virtually any compounds without expensive and laborious mass spectrometry detection. This is because separated spots on the micro-plates can be also sprayed with efficient visualization / derivatisation reagents, enabling detection and/or enhancing sensitivity.” (strona 39). Po pierwsze, przeczy to wcześniejszemu stwierdzeniu, że analizować można tylko związki niskocząsteczkowe, po drugie szereg związków nie posiada reakcji barwnych na tyle charakterystycznych czy czułych, aby je wykryć, nie mówić o analizie ilościowej, za pomocą detekcji spektrofotometrycznej. Przykładem jest tu wiele związków opisanych we wstępie jako mikrozanieczyszczenia środowiska.

- W części wynikowej Pani mgr B. Fenert pokazuje wyniki dla papieru celulozowego impregnowanego n-alkanami. Taki materiał był używany jako adsorbent dla chlorofili. Natomiast pierwszy sorbent jest polarny, a drugi to faza można stwierdzić odwrócona, taki układ to właściwie niepolarny sorbent naniesiony na nośnik celulozowy i służy sorpcji związków niepolarnych. W Rozdziale 4.1.2 nie znalazłam informacji, który układ nadaje się bardziej do analiz wolnych chlorofili w wodzie. Jaka informacja jest pozyskana dzięki obrazowaniu przedstawionym na Rysunku 16? chlorofile to przecież stałe komponenty środowiska wodnego, więc nie jest dziwne, że są tam obecne.
- Na Rys. 29 pojawiają „odciski palca” związków niskocząsteczkowych pobranych za pomocą celulozy lub materiału z mniszka. Po pierwsze nie zgadzam się ze stwierdzeniem, że to odcisk palca. Próbkę pobierano w jednej dacie (jeśli dobrze rozumiem tę część) a więc to próbki chwilowe, należy bowiem pamiętać, że zmienność środowiska wodnego jest ogromna. Przykładowo zmienia się aktywność mikroorganizmów w ciągu doby, sinice mają tropień do światła, falowanie zmienia skład znacznie w ciągu godzin. Stąd znalezienie odcisku palca wymaga wielu badań monitoringowych i scharakteryzowania średniego chemizmu zbiornika. Po drugie, stwierdzono, że materiał zatrzymuje mikroorganizmy, co przedstawiono na zdjęciach. Żeby efektywnie wyekstrahować barwniki z glonów nie wystarczy włożyć materiału do rozpuszczalnika organicznego. Należy się postarać o dodatkowy proces rozkładu ścian i błon (przykładowo przez wymrażanie lub ultradźwięki). A więc w tym przypadku analizowano frakcję wolną barwników. Nie podano też propozycji jakie inne związki małowcząsteczkowe dały sygnały przy różnym wywoływaniu.
- Rozdział 4.2. Nie rozumiem nazywania chlorofili jako celowanych mikrozanieczyszczeń środowiska.
- Wyniki w Tabeli 7B przedstawiające analizę frakcji chlorofili zebranej z oczyszczalni ścieków są powiązane z Rysunkiem S7, S8, które pochodzą z publikacji spoza cyklu. Natomiast z części eksperymentalnej nie wynika, aby Pani B. Fenert pobierała i analizowała próbki ścieków. Stąd pytanie, które w wynikach przedstawionych w rozdziale 4.2. zostały uzyskane z ramienia rozprawy doktorskiej.

- Także z Rozdziale 4.2. pojawia się stwierdzenie, że „*Therefore, using this simple methodology both individual and peaks and total chlorophyll content can be estimated*”. Wyniki te dotyczą próbek pobranych i ekstrahowanych techniką SPE. Należy zwrócić uwagę, że technika SPE pozwala na określenie wolnej frakcji chlorofilu. Nie można więc tych wyników ilościowych uznać za całkowitą ilość chlorofili w próbce, gdyż znaczna jego ilość została w komórkach mikroorganizmów, z których technika SPE nie może ich wydobyć.

Pani mgr Bożena Fenert (indeks h równy 3) jest autorem dziewięciu publikacji, a sześć przedstawionych jako podstawa rozprawy zostały zacytowane 28 razy. Ponadto jest autorem jednego i współautorem 10 streszczeń w materiałach pokonferencyjnych.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska posiada zadowalający poziom naukowy, jednak brakuje wielu wymogów pracy eksperymentalnej (brak jednego celu głównego pracy, brak hipotezy badawczej, brak porównania wyników z literaturą aby można było ocenić nowość naukową) i niejasne główne autorstwo w publikacji będącej podstawą cyklu. Za zaletę pracy uważam próbę wykorzystania nowego bio-materiału do szybkiej oceny stanu środowiska pod względem zawartości wolnych chlorofili.

Praca w mojej ocenie **spełnia wymogi merytorycznych i wymogi formalne Ustawy o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytule z zakresy sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) z dnia 14 marca 2003 i wnoszę o jej dopuszczenie do dalszych etapów postępowania przewodu doktorskiego.**

Z poważaniem,
dr hab. Magda Caban, prof. UG

