

Prof. dr hab.  
PIOTR STEPNOWSKI

Gdańsk, dnia 29 grudnia 2018 roku

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Kalenieckiej pod tytułem „Investigation of supramolecular encapsulation as potential tool for analysis and removal of selected micropollutants from liquid phase”

Ksenobiotyki zaburzające układ hormonalny to bardzo obszerna grupa zanieczyszczeń chemicznych, których obecność potwierdza się od lat różnych komponentach środowiska naturalnego. Substancje te, ze względu na specyfikę strukturalną, elementy której są podobne do naturalnych hormonów, mogą być z nimi „mylone” w obrębie układu biologicznego powodując szereg negatywnych efektów toksykologicznych. Do tej grupy związków chemicznych należą liczne pestycydy, polichlorowane bifenyle, pozostałości farmaceutyków, plastyfikatory, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne i ich metabolity, w końcu polichlorowane dibenzodioksyny i dibenzofurany.

Istnieje cały szereg doniesień literaturowych dowodzących niskiej skuteczności usuwania przynajmniej części z tej grupy związków w konwencjonalnych systemach biologicznego oczyszczania ścieków. Powoduje to ich skuteczne przedostawanie się do zbiorników wód naturalnych, gdzie stanowią chroniczne narażenie dla zamieszkujących tam organizmów żywych. Jednym z najbardziej spektakularnych efektów związanych z obecnością substancji zaburzających układ hormonalny w środowisku wodnym jest postępująca feminizacja samców niektórych gatunków ryb, prowadząca do kurczenia się populacji tych gatunków w skażonym środowisku.

Przedmiotem szczególnego zainteresowania współczesnej technologii i inżynierii środowiska stało się zatem poszukiwanie skutecznych metod eliminacji mikrozanieczyszczeń organicznych ze ścieków oczyszczonych z użyciem metod chemicznych, fotochemicznych oraz biologicznych. Badanie skuteczności tych metod, a także stopnia rozprzestrzeniania się w środowisku tej grupy związków wymaga z kolei stosowania wysoce czułych i selektywnych metod analitycznych umożliwiających ich oznaczanie na śladowych poziomach stężeń.

Oba powyższe wyzwania wpisują się w tematykę rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Kalenieckiej. Dotyczy ona wykorzystania polisacharydowych układów makrocyclicznych z grupy cyklodekstryn jako selektywnych czynników kompleksujących poprzez tzw. enkapsulację molekularną dla wybranych wielopierścieniowych węglowodórów aromatycznych (WWA) i bisfenoli (BF). Badany proces enkapsulacji z użyciem cyklodekstryn znalazł przede wszystkim zastosowanie w opracowanych metodach oznaczania obu grup analitów, ale także jako czynnik wspomagający proces biotransformacji bisfenoli. Badania analityczne prowadzono z wykorzystaniem technik wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz wysokosprawnej chromatografii planarnej z detekcją spektrofotometryczną wspomaganych narzędziami analizy statystycznej. Praca została wykonana pod kierunkiem Pana dr hab. Pawła Zarzyckiego, prof. PK z Katedry Technologii Środowiskowych i Bioanalitiki Politechniki Koszalińskiej, który od wielu lat zajmuje się opracowywaniem nowych metod analitycznych umożliwiających oznaczanie substancji czynnych endokrynnie w różnych typach matryc. Kandydatka mogła zatem rozpocząć swoje zadania badawcze na podstawie mocno ugruntowanych tez, których podstawy eksperymentalne wypracowano przez lata we wcześniejszych badaniach Katedry. Niezależnie od tego, należy uznać, iż wybrana przez doktorantkę tematyka pracy

doktorskiej jest nie tylko bardzo interesująca z użytecznego punktu widzenia, ale i wnosi wkład w poznanie podstawowych zagadnień, zarówno na różnych etapach procesu analitycznego jak i w obrębie interpretacji wyników badań.

Praca doktorska mgr inż. Aleksandry Kalenieckiej napisana jest w języku angielskim. Ma układ nietypowy, w moim odczuciu znacząco utrudniająca lekturę. Lity tekst dysertacji zajmuje pierwsze 42 strony, po czym następuje 27 stron z tabelami, w końcu kolejnych 49 stron z rysunkami, schematami i zdjęciami. Poszukiwanie właściwych odniesień liczbowych czy graficznych wymaga więc każdorazowego przewertowania dysertacji. Następnie zamieszczono spis literatury pogrupowany latami, a nie według porządku cytowań (kolejna niedogodność), po czym następuje spis prac własnych, opisanych jako związanych z doktoratem (cyt. *related to this PhD thesis*). Ich faktyczny związek z rozprawą jest różny. Bezpośrednio z wynikami doktorskimi związana jest jedynie praca nr [5]. Pozostałe dotyczą rozwiązań analitycznych wypracowanych w Katedrze (część również stosowana w badaniach doktorskich) oraz przeglądu literatury nt. obecności farmaceutyków w środowisku (związek z doktoratem znikomy). Następnie umieszczono dwa streszczenia, w języku angielskim i polskim, po czym kopie dwóch publikacji współautorstwa kandydatki. Pierwsza z nich to wyżej wymieniony przegląd literatury, druga to wspomniana publikacja współautorska nr [5] zawierająca wyniki prezentowane w dysertacji.

Pracę rozpoczyna krótki wstęp i część teoretyczna, prezentująca dość lakonicznie zjawisko czynności endokrynej wybranych ksenobiotycznych mikrozanieczyszczeń. W pracy oprócz ogólnie dostępnych informacji na ten temat nie odniesiono się niestety do zasadniczej dla tego zjawiska zależności struktura – aktywność badanych związków, co znacząco ułatwiłoby późniejszą interpretację uzyskanych wyników. Za zbyt krótką uważam także część dotyczącą samych cyklodekstryn. Mechanizmy enkapsulacji, selektywność strukturalna, selektywność izomeryczna i in. to wszystko zagadnienia, które również należałoby opisać na poziomie oddziaływań molekularnych, co w konsekwencji znacząco przybliżyłoby czytelnika do późniejszej interpretacji uzyskanych wyników.

Cel pracy podzielono na trzy odrębne zagadnienia. Ich wspólnym mianownikiem jest niewątpliwie wykorzystanie kompleksów supramolekularnych tworzonych przez cyklodekstryny z WWA i BF. Pierwsze z nich dotyczyło badań specyficznych oddziaływań gość – gospodarz powyższych kompleksów w gradiencie temperaturowym różnymi technikami rozdzielczymi. Z kolei drugie obejmowało badania analityczne mające na celu potwierdzenie obecności i ewentualną ocenę narażenia na występowanie wybranych BF w produktach codziennego użytku oraz w oczyszczonych ściekach. Trzecie zagadnienie dotyczyło badań nad efektywnością usuwania tej grupy zanieczyszczeń z wody z użyciem rzęsy wodnej *Lemna minor* w obecności cyklodekstryny.

Większość z uzyskanych przez doktorantkę wyników oceniam wysoko. Za najważniejsze osiągnięcia kandydatki uważam:

- Systemowe przeanalizowanie zjawiska enkapsulacji molekularnej z użyciem  $\beta$ -cyklodekstryny i 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstryny na przykładzie naftalenu i jego pochodnych oraz grupy wybranych bisfenoli (A, B, C, E, F, S, Z, AF, AP, BP i FL) oraz zaproponowanie mechanizmu kompleksowania, który może być wykorzystany w projektowaniu procesów ekstrakcji WWA z faz ciekłych,
- Optymalizację procesu rozdzielania bisfenoli z ekstraktów metodą wysokosprawnej inkluzyjnej chromatografii cieczowej w trybie izokratycznym w zależności od temperatury, oraz dowiedzenie wysokiej selektywności oddziaływań w przypadku użycia obu cyklodekstryn.
- Zastosowanie opracowanych metodyk analitycznych w szybkim, przesiewowym oznaczaniu bisfenoli w produktach codziennego użytku oraz materiałach stykających się z żywnością, ze wskazaniem ewentualnych zagrożeń emisyjnych niektórych materiałów, szczególnie w warunkach podwyższonej temperatury.

Wykazanie przydatności opracowanych metod analitycznych do analiz bisfenoli w złożonych matrycach organicznych, w szczególności dla celów monitorowania procesów technologicznych oczyszczania ścieków komunalnych.

- Dowiedzenie na podstawie eksperymentu wielowariancyjnego z użyciem rzęsy wodnej oraz cyklodekstryny możliwości użycia biomasy organizmów wodnych do redukcji bisfenoli ze skażonych wód.

Z kolei poniżej wymieniam zagadnienia budzące moje wątpliwości oraz pytania jakie pojawiły się w trakcie lektury dysertacji:

- W przeprowadzonych badaniach potwierdzono istotne różnice w retencji kompleksów supramolekularnych cyklodekstryn i 1-acenaftenolu w zależności od temperatury podczas ich rozdzielania techniką planarną, co stoi w sprzeczności z typowym mechanizmem eluowania polarnego kompleksu z czołem fazy w technice kolumnowej. Autorka postuluje, że jest to efekt istotnych różnic w rozpuszczalności tych kompleksów i kinetyce ich wytrącania. To bardzo ciekawe odkrycie, które umożliwia zastosowanie technik planarnych lub mikroprzepływowych do zwiększonej retencji kompleksów o wysokiej polarności. Zastanawiam się jednak czy wytrącone kompleksy w układzie kolumnowym nie powinny zachowywać się podobnie? Czy według kandydatki możliwe są inne czynniki (np. steryczne, wynikające z geometrii / symetrii kompleksu) które mają wpływ na takie zachowanie się w układzie planarnym?
- Wykonując analizę głównych składowych danych spektrofotometrycznych kompleksów CD-WWA doktorantka postuluje możliwość jej wykorzystania do przewidywań silnych oddziaływań gość-gospodarz. Czy na podstawie uzyskanych wyników można pokusić się o sformułowanie konkretnych reguł strukturalnych wiązanych cząsteczek, które wpływają na intensywność, ewentualną odwracalność tych oddziaływań?
- W badaniach przesiewowych zawartości bisfenoli w różnych matrycach doktorantka potwierdziła ich obecność także w wodzie destylowanej. Jeżeli była to woda pochodząca z laboratorium, w którym wykonywano oznaczenia to czy nie oznacza to, że istnieje tam tło, które należałoby uwzględnić w próbach zerowych bądź ślepych?
- Badając efektywność usuwania bisfenoli w obecności biomasy rzęsy wodnej i cyklodekstryn doktorantka przeprowadziła analizę PCA zidentyfikowanych obiektów scharakteryzowanych określonymi zmiennymi identyfikując wyodrębnienie bisfenolu S wobec pozostałych związków. W tekście rozprawy nie znalazłem jednak wyjaśnienia tej obserwacji.
- W konkluzjach rozprawy możemy przeczytać, że uzyskane wyniki są dobrą podstawą projektowania procesów technologicznych mogących usuwać badane związki ze ścieków z użyciem makrocyclicznych polisacharydów. Sądzę, że taki wniosek jest jednak dalece przedwczesny biorąc pod uwagę zarówno złożoność matrycy, skalę procesową oraz warunki przepływowe. Czy kandydatka mogłaby zdefiniować zakres dodatkowych badań, które należałoby wykonać przed faktyczną próbą skalowania takiego procesu?

Przytoczone wątpliwości nie mają istotnego charakteru i nie podważają w żadnej mierze wartości rozprawy i mojej pozytywnej jej oceny. Reasumując, uważam, że cel pracy został zrealizowany, a postawione przez autorkę tezy znalazły potwierdzenie. Rozprawa mgr inż. Aleksandry Kalenieckiej zawiera wartościowy, miejscami nowatorski oraz solidny materiał badawczy, a Kandydatka wykazała się ponadto biegłą znajomością technik laboratoryjnych w zakresie analityki chromatograficznej oraz analizy statystycznej.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Inżynierii Lądowej, Środowiska i Geodezji o dopuszczenie mgr inż. Aleksandry Kalenieckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

