

Recenzja
rozprawy doktorskiej pt.
„Kinetyka mikrobiologicznego rozkładu wybranych lotnych związków
organicznych”
wykonanej przez Panią mgr inż. Agnieszkę Gąszczak
w Instytucie Inżynierii Chemicznej PAN

1. Istotność tematyki podjętej w doktoracie

Recenzowana praca dotyczy istotnego zagadnienia jakim jest wykorzystanie mikroorganizmów do usuwania zanieczyszczeń obecnych w powietrzu. Jest to podejście zgodne z ideą tzw. zielonych technologii, które w tym przypadku w związku z wykorzystaniem naturalnych katalizatorów (w tym przypadku mikroorganizmów) dąży do opracowania procesu przyjaznego środowisku naturalnemu. Jak Autorka pracy podaje jej badania były jednym z etapów realizacji projektu usuwania zanieczyszczeń organicznych obecnych w powietrzu w trójfazowym bioreaktorze ze stałym złożem. Jako przedmiot badań Autorka wybrała dwie lotne substancje organiczne: octan winylu, substancję stosowaną na dużą skalę w produkcji m.in. klejów, farb, żywic, folii itp. oraz styren stosowany m.in. przy produkcji tworzyw sztucznych. Oba te związki oprócz powszechnego stosowania w produkcji charakteryzują się wysoką toksycznością oraz łatwopalnością i wybuchowością.

Wybrane substancje różnią się budową i stąd również podatnością na biodegradację. Styren jako związek z pierścieniem aromatycznym uważany jest za trudno biodegradowalny. W literaturze tematu jest stosunkowo niewiele prac

poświęconych biodegradacji tych związków (zwłaszcza octanowi winylu). Dodatkowo badania mikrobiologiczne wymagają wyznaczenia parametrów kinetycznych dla stosowanego, konkretnego szczepu; dane literaturowe mogą służyć jedynie jako punkt odniesienia (w żaden sposób parametry kinetyczne nie mogą zostać przeniesione ze szczepu na szczep).

Ponieważ ochrona środowiska, w tym powietrza stanowi wyzwanie XXI wieku tematykę doktoratu uznaję jak najbardziej za istotną. Praca wykorzystuje narzędzia inżynierii chemicznej do opisu procesów bioreaktorowych.

2. Formalna ocena manuskryptu

Przygotowana praca doktorska liczy 166 stron, 70 rysunków i 15 tabel. Bibliografia jest obszerna, liczy 161 pozycji, z dominującą ilością publikacji anglojęzycznych.

Praca zredagowana jest w siedmiu punktach, w sposób odbiegający od klasycznego układu prac dyplomowych i doktorskich. Po rozdziale wprowadzającym przedstawiony został cel pracy, następnie rozdział 3 oparty na literaturze i dalej rozdziały 4 -6 całkowicie autonomiczne (każdy z nich zawiera szczegółowy przegląd literaturowy dotyczący prezentowanego zagadnienia, następnie opis stosowanych metod, dalej opis i interpretację uzyskanych wyników badań). Rozdział 7 to podsumowanie i wnioski. Daleki od klasycznego układ pracy początkowo wprowadza czytelnika w lekką konsternację, niemniej przy dalszej lekturze pracy wprowadzony przez Autorkę układ pracy staje się akceptowalny. Do pracy dołączono spis oznaczeń, aneks złożony z 5 tabel i 2 rysunków oraz płytę CD zawierającą pracę w wersji elektronicznej. Szkoda, że na płycie nie zostały zarchiwizowane punkty pomiarowe, które pozwoliłyby przy wykonywaniu recenzji na analizę przeliczeń wykonanych przez Doktorantkę.

Praca jest przygotowana bardzo starannie; wykresy są bardzo estetyczne, czytelne. Praca napisana jest poprawnym, ładnym językiem. Czyta się ją z dużym zainteresowaniem.

3. Ocena merytoryczna

Rozdział 1 pracy, jak wskazuje jego nazwa, jest wprowadzeniem do zagadnienia. Autorka zwięźle nakreśliła problem zanieczyszczeń powietrza, pokrótce opisała klasyczne metody usuwania zanieczyszczeń organicznych w nim zawartych. Rozdział ten stanowił podstawę do sformułowania celu pracy. Autorka zaznaczyła w nim, że część opisana w pracy doktorskiej jest częścią realizowanego w Instytucie Inżynierii Chemicznej PAN grantu; częścią technologii usuwania lotnych zanieczyszczeń organicznych z powietrza w reaktorze trójfazowym ze złożem stałym. Celem pracy doktorskiej był dobór szczepów zdolnych do biodegradacji wybranych związków wraz z pełną charakterystyką procesu biodegradacji: statyką i kinetyką procesu prowadzonego w trybie okresowym i ciągłym.

Rozdział 3 to szeroki (chyba nawet za bardzo) opis wybranych do biodegradacji związków: octanu winylu i styrenu. W rozdziale tym pokazano jak powszechnie są one wykorzystywane oraz wskazano, że ich emisja do środowiska naturalnego z uwagi na wzrost produkcji z ich wykorzystaniem będzie mieć tendencję wzrostową. Następnie w rozdziale 3.3. przedstawiono bardzo szczegółowo opis biologicznego rozkładu tych związków wraz z rozrysowaniem szlaków metabolicznych w procesie ich biodegradacji. Rozdział 3 ma charakter czysto teoretyczny, stąd trochę dziwi, że został on umieszczony po celu pracy.

Rozdział 4 rozpoczyna opis przeprowadzonych eksperymentów, w tym że nietypowo (podobnie jak dwa następne rozdziały) zawiera on w sobie opis procedur i uzyskane wyniki wraz z ich graficznym przedstawieniem. Prawidłowo, zgodnie z przyjętymi standardami, przeprowadzono izolację mikroorganizmów z miejsca występowania zanieczyszczeń (w tym przypadku z terenów Firmy Chemicznej Dwory S.A. w Oświęcimiu). W tym celu przeprowadzono liczne hodowle namnażane początkowo na łatwo przyswajalnych źródłach węgla: glukozie lub fenolu. Następnie wykorzystując zdolność bakterii do wytwarzania enzymów indukowanych, do hodowli dodawano odpowiednio octan winylu lub styren, przy wzrastających w czasie dawkach zanieczyszczenia. W ten sposób sukcesem zakończyła się izolacja dwóch szczepów (EC3_2001 i EC1_2004) zakwalifikowanych jako *Pseudomonas putida* w przypadku octanu winylu. W przypadku styrenu nie udało się wyizolować szczepów odpornych na podwyższone stężenie styrenu, stąd pracowano wyłącznie na szczepie zakupionym

z kolekcji Technical Research Centre of Finland. Szczep te wyizolowano z biofiltra i został zidentyfikowany jako *Pseudomonas sp.* E-93486, a najbliższy swym genomem był do *Pseudomonas putida* i *Pseudomonas stutzeri*. Dalsze badania prowadzono dla szczepów EC3_2001, EC1_2004 oraz zakupionych *Pseudomonas fluorescens* (PCM 2123) i *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 w przypadku octanu winylu oraz *Pseudomonas sp.* E-93486 w przypadku styrenu. W dalszych etapach badań mikrobiologicznych określono aktywność enzymów biorących udział w szlaku metabolicznym rozkładu octanu winylu oraz styrenu. Potwierdzono zdolność szczepu *Pseudomonas sp.* E-93486 do rozkładu styrenu, a spośród szczepów biodegradujących octan winylu na podstawie aktywności enzymów do dalszych badań wytypowano *Pseudomonas putida* EC3_2001 (przez Autorkę w dalszej części pracy oznaczane jako *Pseudomonas sp.* EC3_2001) oraz *Pseudomonas fluorescens* PCM 2123. Następne kilka stron rozdziału 4 poświęcone jest standardowym badaniom doboru warunków hodowli (składu kluczowych składników pożywki, jej pH, temperatury hodowli).

Rozdział 5 poświęcony jest kinetyce wzrostu biomasy i utylizacji substratu. Jest to najobszerniejszy rozdział pracy, bogaty w wyniki z hodowli prowadzonej w trybie okresowym. Rozdział rozpoczyna się przedstawieniem teorii na temat wyznaczania wartości właściwej szybkości wzrostu. Są to podstawowe informacje i ich prezentacja w pracach typowo mikrobiologicznych byłaby zbyt cenna. Niemniej w przypadku prac interdyscyplinarnych, do których zalicza się recenzowana praca, przypisuję obecność tego fragmentu pracy, chęcią wprowadzenia w tematykę procesów bioreaktorowych czytelników nie mających na co dzień do czynienia z tego typu procesami. W teorii bioreaktorów mikrobiologicznych wprowadzić można znaleźć wiele analogii do reaktorów chemicznych, niemniej specyfika namnażania biomasy skutkująca wzrostem masy (aktywności) katalizatora w czasie, jest zagadnieniem bardzo specyficznym.

Badania prowadzono w reaktorze mieszalnikowym. Z uwagi na lotność substratów Autorka jako źródło tlenu stosowała nadtlenek wodoru. Był to słuszny zabieg; gdyż rodzaj *Pseudomonas* jako nieliczny rodzaj bakterii wytwarza katalazę – enzym pozwalający na uzyskanie z H_2O_2 tlenu cząsteczkowego. Postęp procesu biodegradacji Autorka monitorowała poprzez analizę chromatograficzną (GC), zaś towarzyszący mu przyrost biomasy określany był poprzez analizę spektrofotometryczną OD. W tym celu autorka zgodnie z zasadami wykonała krzywe standardowe metodą tzw. suchej masy.

W opisie Autorka podaje, że objętość robocza fazy reakcyjnej wynosiła 2,7 litra. Jak się ta objętość miała do całkowitej objętości zbiornika? W przypadku dużych różnic należy się liczyć ze stratą substratu na skutek desorpcji do warstwy powietrza znajdującej się nad cieczą. Czy odpowiedzią na to pytanie może być wykres 5.14, który pokazuje stałość stężenia? Wątpliwość pojawia się, gdyż nie jest wiadomo, czy doświadczenie to było prowadzone w takich samych warunkach w reaktorze jak badania nad biodegradacją. Równocześnie obserwowany jest bardzo wyraźny spadek stężenia substratu w pierwszych minutach procesu, co by potwierdzało desorpcję substratu do fazy gazowej.

Hodowle okresowe przebiegają zadziwiająco szybko (Rys. 5.9, 5.15). W przypadku octanu winylu zadziwiający jest brak widocznej fazy zastoju. Jak można wytłumaczyć to zjawisko? Faza zastoju występuje nawet na bardzo dogodnych podłożach np. z glukozą; tym bardziej należałoby się spodziewać w przypadku biodegradacji.

Przeprowadzenie hodowli przy różnych początkowych stężeniach substratu pozwoliło Autorce na wykreślenie dla każdej z hodowli zależności $\ln(X)=f(t)$ pozwalającej na odczytanie właściwej szybkości wzrostu przy danym stężeniu substratu (w założeniu, że jest to jedyny czynnik limitujący). Na wyróżnienie zasługuje liczba punktów pomiarowych przy wykreślaniu tych wykresów, co świadczy o pracowitości Doktorantki. Niestety, wykreślając Rys. 5.16 (i analogicznie 5.19) Autorka nie ustrzegła się bardzo powszechnie stosowanego błędu przy wyznaczaniu wartości stałych na podstawie procesów okresowych, przebiegających w stanie nieustalonym. Na wykres 5.16 Autorka naniosła stężenie początkowe substratu, przy czym obliczenia dotyczyły fazy logarytmicznej, gdzie stężenie zmieniało się bardzo szybko i pod jej koniec wynosiło połowę wartości startowej. Nie jest to najlepsze rozwiązanie, ale mniejszy błąd wnosi przyjęcie średniej wartości stężenia substratu w fazie logarytmicznej.

Uzyskana zależność $S/\mu=f(S)$ pozwoliła bez wątpienia stwierdzić, że w badanym układzie z octanem winylu występuje inhibicja substratowa, stąd słusznie Autorka zasięgnęła literaturowych postaci równania kinetycznego opisujących to zjawisko. Za pomocą programu NLREG w oparciu o metodę najmniejszych kwadratów Autorka wyznaczyła stałe ww. równań kinetycznych. W oparciu o wartość błędu względnego do dalszych rozważań wybrane zostało równanie Haldane. Jest to najpowszechniej stosowane równanie do opisu procesów mikrobiologicznych przebiegających z inhibicją

substratową; niemniej na podstawie przedstawionych w Tabeli 5.4. wartości wydawałoby się, że z najlepszą dokładnością zależność kinetyczną opisuje równanie Aiba.

Analogiczne badania prowadzono dla styrenu, w przypadku którego obserwowano krótką fazę zastoju. Do opisu szybkości wzrostu Autorka również zastosowała równania kinetyczne z inhibicją substratową, dla każdego z nich uzyskując zaskakująco niski błąd względny (5-6%). To moje zaskoczenie wynika z faktu, że studiując zależność wykreśloną na Rys. 5.20 skłaniałabym się do stwierdzenia, że w badanym zakresie stężeń (bardzo wąskim ze względu na rozpuszczalność styrenu w fazie wodnej) wzrost mikroorganizmów jest niezależny od stężenia substratu. Stwierdzenie to by popierał fakt, że wzrost stężenia mikroorganizmów przebiegał ze stałą szybkością do wyczerpania substratu (Rys. 5.18). Uzyskane wartości stałych kinetycznych Autorka porównała z wartościami literaturowymi. Z porównania tego wyniknęło, że stosowany w badaniach szczep *Pseudomonas sp.* Biodegraduje styren z relatywnie dużą szybkością.

Na str. 96 pojawia się sformułowanie: „Parametrem umożliwiającym transformację równania, opisującego szybkość wzrostu mikroorganizmów, w równanie opisujące szybkość utylizacji substratu wzrostowego jest tzw. współczynnik wydajności biomasy Y_{XS} ”. Szczęśliwie u Autorki (przede wszystkim z uwagi na brak lub prawie brak w przypadku styrenu fazy zastoju, długi czas trwania fazy logarytmicznej współczynnik stechiometryczny przyjmuje stałą wartość. W rzeczywistości w hodowli okresowej współczynnik ten z reguły zmienia się w czasie (jest niski w fazie zastoju i w fazie stacjonarnej, a najwyższy w fazie logarytmicznej) i wówczas wiązanie zmiany stężenia substratu ze zmianą stężenia komórek musiałoby mieć charakter różniczkowy. Autorka ten problem ominęła wyznaczając $(Y_{XS})_{obs}$ tylko w fazie logarytmicznej, ale nie jest to do końca poprawne. Wykreślone na Rys. 5.24 proste nie przechodzą przez punkt (0,0) to potwierdza tę nieprawidłowość. Nieściśłość na tym etapie skutkuje następnie błędnie wysuniętym wnioskiem pod Rys. 5.25, że $(Y_{XS})_{obs}$ zmienia się wraz z μ (wg mnie jest to w zakresie błędu analitycznego i przeczy wcześniej prezentowanej liniowej zależności na Rys. 5.24), a jeżeli już taka zmiana byłaby widoczna to właśnie wynikałaby z tego, że $(Y_{XS})_{obs}$ należy liczyć po całej hodowli.

W rozdziale 5.5. opisano wpływ temperatury na szybkość wzrostu komórek poprzez energię aktywacji. W tabeli 5.7 zaprezentowano wartości uzyskane przez

innych badaczy dla różnych substratów organicznych. Otrzymano niską wartość energii aktywacji, co potwierdziło prezentowane już uprzednio wyniki (Rys. 4.6) wskazujące na niewielki wpływ temperatury na wzrost *Pseudomonas sp.* E-93486. Po części wniosek ten jest wynikiem testowania wąskiego zakresu temperatur 22-35°C, ale jest to specyfika prac z mikroorganizmami, że zakres temperatur jest bardzo ograniczony (szczególnie przy mezofilach).

Rozdział 6 zatytułowany jest „Wyznaczanie parametrów przemiany podstawowej” i w rozdziale tym Autorka prostuje błędy popełnione przy wyznaczaniu $(Y_{XS})_{obs}$ w rozdziale 5, o których mowa była powyżej w recenzji. Prezentowane w tym rozdziale wyniki dotyczą hodowli prowadzonych w systemie ciągłym, które to z uwagi na warunki ustalone pozwalają na znacznie poprawniejsze wyznaczenie współczynników stechiometrycznych i równania kinetycznego. Przy dynamice hodowli okresowych przeprowadzenie hodowli w systemie ciągłym jest wręcz niezbędne, ale niepopularne wśród mikrobiologów. Ten etap eksperymentów wymagający umiejętności zaplanowania eksperymentów i ich przeprowadzenia ma w dużej mierze charakter inżynierski.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów przy różnym stężeniu substratu w strumieniu dozowanym i stałej wartości szybkości rozcieńczania oraz różnej szybkości rozcieńczania przy stałym stężeniu substratu w strumieniu dozowanym Autorka wyznaczyła poprawnie stałą wartość współczynników $(Y_{X/S})_{max}$ i przemiany podstawowej m_e . Dyskusyjne jest, że szybkość rozcieńczania przy różnym stężeniu substratu była tak dobrana, że stężenie substratu w stanie ustalonym spadło w reaktorze do zera (lub wartości bliskiej zera). Wydaje się, że mogło to mieć wpływ na zniżenie stężenia biomasy.

Dla hodowli ze styrenem poprzez zmianę szybkości rozcieńczania Autorka zastosowała opisaną w literaturze metodę wyznaczania μ_{max} . Metoda ta dotyczy procesów opisanych równaniem Monoda (nie uwzględnia inhibicji substratowej). Być może dlatego metoda nie została zastosowana do hodowli na octanie winylu? Dla sugerowanej przeze mnie zależności 0 rzędu do opisu wzrostu na styrenie $r_X = \mu_{max} \cdot X_b$ przyjęta metoda jest poprawna.

Rozdział 6.4. to weryfikacja modeli kinetycznych opracowanych na podstawie literatury zrealizowana w samodzielnie napisanym przez Autorkę programie w języku Turbo-Pascal. Weryfikacja ta wypadła pomyślnie dla hodowli na styrenie, zaś

w przypadku octanu winylu zaobserwowano odstępstwo w fazie stacjonarnej. Może jest to wynik braku weryfikacji stałej μ_{\max} w hodowli ciągłej jak to uczyniono w przypadku styrenu?

Ostatni rozdział pracy doktorskiej to Podsumowanie i wnioski, w którym zestawiono uzyskane wartości będące celem pracy tj.: współczynników stechiometrycznych i stałych równania kinetycznego oraz rozpisano równanie stechiometryczne reakcji przekształcania octanu winylu i styrenu z uwzględnieniem także biomasy jako produktu.

Korekta pracy była staranna. Odnotowano jedynie drobne uchybienia typu:

- stosowanie różnych jednostek np. stężenie substratu jest wyrażane raz w ppm, innym razem podawane są μl dodane do jakiejś objętości w ml, jeszcze w innym miejscu g/m^3 ; podobne rozbieżności są przy wyznaczaniu stężenia komórek;
- rozpoczynanie myśli raz od nowego akapitu, innym razem od nowej linii bez wcięcia;
- błędne podpisy osi y na Rys. 5.7 i 5.8
- nie wszystkie symbole zestawiono w tabeli w rozdziale 8 – brakuje min. e_Y , q_m
- podpis tabeli A3 jest niekompletny (nie wiadomo jakiego związku dotyczy tabela)

4. Ocena końcowa

Prezentowana praca należy do prac interdyscyplinarnych. Do jej wykonania niezbędna była wiedza i umiejętność prowadzenia eksperymentów zarówno z mikrobiologii jak i inżynierii reaktorów. W pracy zastosowano poprawne dla obu nauk metody badawcze.

Wysoko oceniam uzyskane wyniki. Badania prowadzone w bioreaktorze mikrobiologicznym są żmudne, mało powtarzalne, a w przypadku rozpatrywanego układu dodatkowy problem stanowiła lotność substratów. Opracowany model kinetyki procesu biodegradacji może posłużyć do projektowania oczyszczania gazów w trójfazowym reaktorze.

Przedstawione w recenzji uwagi nie zmieniają ogólnej, pozytywnej oceny recenzowanej rozprawy doktorskiej, a pewne wątpliwości i uwagi recenzenta powinny być wyjaśnione podczas publicznej obrony pracy doktorskiej.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma charakter zarówno doświadczalny, jak i obliczeniowy. Doktorantka wykazała się dużą wiedzą w zakresie kinetyki przemian mikrobiologicznych i opisu procesów bioreaktorowych. W mojej ocenie spełnia ustawowe i zwyczajowe wymagania oczekiwane od prac doktorskich. Stawiam zatem wniosek o dopuszczenie mgr inż. Agnieszki Gąszczak do publicznej obrony swojej dysertacji.

Aleksandra Krawiec