

Prof. dr hab. Monika Załęska-Radziwiłł  
Politechnika Warszawska  
Wydział Instalacji Budowlanych  
Hydrotechniki i Inżynierii Środowiska

Warszawa 17. 09. 2018 r.

## RECENZJA

Rozprawy doktorskiej **mgr Katarzyny Kurnik**

p.t.: „**Biomasa odpadowa pochodzenia roślinnego jako źródło peroksydaz na potrzeby bioremediacji ścieków skażonych związkami fenolowymi**”

Promotor

dr hab. Jarosław Tyburski, prof. UMK

Promotor pomocniczy

dr Krzysztof Treder

### **Podstawa formalna**

Recenzję pracy doktorskiej mgr Katarzyny Kurnik opracowano zgodnie z uchwałą Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, na podstawie pisma Pana Dziekana prof. dr hab. Wernera Ulricha z dnia 28. 06. 2018 r.

### **Celowość podjęcia tematu**

Materiały odpadowe mogą stanowić cenny surowiec do uzyskiwania z nich szeregu produktów użytecznych. Najbardziej predestynowanymi źródłami odzysku tych produktów są ścieki i odpady głównie z przemysłu spożywczego, papierniczego, ścieki bytowo-gospodarcze, stałe odpady drzewne i osady ściekowe. Najczęściej odpady te wykorzystane są w procesach biotechnologicznych zachodzących przy udziale mikroorganizmów do uzyskiwania między innymi kompostu, biopaliwa, białka paszowego, enzymów, polisacharydów, kwasów organicznych, biocyn, biologicznych substancji powierzchniowo-czynnych i biopestycydów. Opracowywane technologie wykorzystujące odpady do uzyskiwania z nich produktów użytecznych oraz podjęte w pracy badania wpisują się w aktualny trend w gospodarce światowej, w którym zwraca się szczególną uwagę, aby intensyfikacji produkcji towarzyszyło zrównoważone wykorzystanie zasobów naturalnych

i szerokie stosowanie technologii sprzyjających ochronie środowiska.

Biorąc powyższe pod uwagę uważam tematykę rozprawy doktorskiej za aktualną a jej wybór w pełni uzasadniony.

### **Analiza treści pracy i ocena merytoryczna**

Przedstawiona rozprawa doktorska zgodnie ze znowelizowanymi przepisami Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytułach w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami), została złożona w formie jednotematycznego cyklu publikacji pod wspólnym tytułem: **„Biomasa odpadowa pochodzenia roślinnego jako źródło peroksydaz na potrzeby bioremediacji ścieków skażonych związkami fenolowymi”** opublikowanych w latach 2015-2018:

1. **Kurnik K.**, Treder K., Skorupa-Kłaput M., Tretyn A., Tyburski J., 2015. Removal of phenol from synthetic and industrial wastewater by potato pulp peroxidases. *Water Air Soil Pollut* 226:254. **IF<sub>5-letni</sub> - 1,932 MNiSW – 25 pkt.**
2. **Kurnik K.**, Treder K., Twarużek M., Grajewski J., Tretyn A., Tyburski J., 2018. Potato pulp as the peroxidase source for 2,4-dichlorofenol removal. *Waste Biomass Valor* 9: 1061-1071. **IF<sub>5-letni</sub> - 1,491 MNiSW – 20 pkt.**
3. **Kurnik K.**, Krzyżyński M., Treder K., Tretyn A., Tyburski J., Study on utilizing solid food industry waste with brewers' spent grain and potato pulp as possible peroxidase sources. *J Food Biochem* 42:e 12446. **IF<sub>5-letni</sub> - 0,983 MNiSW – 20 pkt.**

**Sumaryczny współczynnik wpływu (IF) – 4,406**

**Sumaryczna punktacja MNiSW – 65 pkt.**

Załączone publikacje zostały poprzedzone komentarzem autorskim zawierającym kolejno: Wprowadzenie (1), Materiał i metody badawcze (2), Omówienie wyników (3), Wnioski (4), Streszczenia w języku polskim i angielskim (5) i Piśmiennictwo (6).

Pani mgr Katarzyna Kurnik jest pierwszym autorem wszystkich wymienionych w rozprawie artykułów, a jej udział merytoryczny w publikacjach potwierdzony załączonymi oświadczeniami wynosił od 60% do 65%. Dane te wskazują na wiodącą rolę Doktorantki w ich opublikowaniu. Wkład ten polegał na wykonywaniu badań eksperymentalnych, opracowaniu i analizie wyników a także przygotowaniu tekstu publikacji.

Celem dysertacji była ocena aktywności peroksydaz obecnych w wycierce

ziemniaczanej i w młócie jęczmiennym oraz zbadanie możliwości użycia ich do usuwania fenoli ze ścieków.

W pracy przedstawiono dwie hipotezy badawcze:

1. W wycierce ziemniaczanej i w młócie jęczmiennym po zakończeniu procesów technologicznych obecne są peroksydazy o wysokiej aktywności enzymatycznej;
2. Aktywność peroksydazową wycierki ziemniaczanej można wykorzystać do usuwania związków fenolowych ze ścieków i obniżenia ich toksyczności.

W celu weryfikacji przedstawionych hipotez Doktorantka wykonała badania eksperymentalne obejmujące:

- ✓ Izolację peroksydaz z biomasy odpadowej, ocenę ich aktywności oraz analizę parametrów kinetycznych i stabilności;
- ✓ Określenie optymalnych warunków usuwania fenolu i 2,4-dichlorofenolu z roztworów wodnych i ścieków przemysłowych.
- ✓ Testy toksyczności.

Izolacja peroksydaz z biomasy odpadowej z podziałem na frakcje związane jonowo i kowalencyjnie ze ścianą komórkową obejmowała ekstrakcję, dializę oraz zagęszczanie. Do oznaczenia ich aktywności użyto izolatów z wycierki ziemniaczanej i młóta jęczmiennego oraz surowej wycierki ziemniaczanej. Parametry kinetyczne ( $K_m$  i  $V_{max}$ ) wyznaczono dla frakcji związanej jonowo wyizolowanej z obydwu odpadów a dla frakcji związanej kowalencyjnie tylko dla enzymów wyizolowanych z wycierki ziemniaczanej.

Badania stabilności peroksydaz podczas przechowywania prowadzono w trzech wariantach: z dodatkiem glicerolu przechowywane w 4°C i - 20°C oraz bez dodatku glicerolu w 4°C. Pomiar aktywności prowadzono przez 90 dni.

W celu określenia wzorca izoenzymów i wszystkich, białek preparaty enzymatyczne poddane zostały elektroforezie w warunkach natywnych oraz redukujących i denaturujących.

Do oceny przydatności peroksydaz do usuwania fenolu i 2,4-dichlorofenolu z roztworów wodnych i ścieków przemysłowych wykorzystano jako źródło peroksydaz surową wycierkę ziemniaczaną. Optymalizacja procesu usuwania związków fenolowych ze ścieków obejmowała analizę wpływu pH (od 2 do 10), temperatury (10°C - 60°C), szybkości wytrząsania (0 - 250 rpm) oraz dodatku glikolu polietylenowego – PEG 3350 (100 mg/l i 200 mg/l). Ocenę efektywności usuwania związków fenolowych z próbek przeprowadzono na podstawie oznaczonych stężeń związków fenolowych.

Badania toksykologiczne wodnych roztworów fenolu i 2,4- dichlorofenolu oraz roztworów poreakcyjnych obejmowały test wzrostowy z *Lepidium sativum* oraz enzymatyczny z użyciem

komórek nerek świńskich – MTT.

Zaprezentowany zakres badań wskazuje na interdyscyplinarny charakter recenzowanej pracy doktorskiej.

Część teoretyczna rozprawy zawarta w komentarzu Autorki oraz w załączonych publikacjach, uwzględniająca dane z najnowszych pozycji piśmiennictwa stanowi dobre wprowadzenie do badań własnych Doktorantki. Warsztat badawczy zaprezentowany w metodyce badań reprezentuje wysoki poziom merytoryczny.

Wyniki badań potwierdziły, że zarówno w wycierce ziemniaczanej oraz w młócie jęczmiennym obecne są aktywne peroksydazy. Szczególnie ekstrakty enzymatyczne zawierające frakcję jonowo związaną ze ścianą komórkową charakteryzowały się dużą aktywnością, wyższą od uzyskiwanej przez innych badaczy dla różnych preparatów roślinnych. Ustalono również, że w wycierce ziemniaczanej obecnych jest siedem izoenzymów peroksydaz a w młócie jęczmiennym dwa.

Na podstawie analizy uzyskanych w pracy parametrów kinetycznych wykazano, że powinowactwo substratowe badanych peroksydaz było porównywalne z uzyskiwanym dla enzymów pochodzących z innych rodzajów biomasy roślinnej.

W badaniach nad stabilnością aktywności enzymatycznej peroksydaz podczas przechowywania ekstraktów z obydwu materiałów roślinnych ustalono, że zachowują one wysoką aktywność przez 90 dni we wszystkich rozważanych wariantach przechowywania. Dane te odnoszą się do frakcji związanej jonowo ze ścianą komórkową, preparaty frakcji związanej kowalencyjnie szybko traciły aktywność enzymatyczną.

Obiecujące wyniki uzyskano w badaniach nad usuwaniem fenolu i 2,4-dichlorofenolu z roztworów wodnych oraz ścieków przemysłowych przez peroksydazy obecne w wycierce ziemniaczanej. W zależności od stężenia początkowego związków w próbkach uzyskiwano ponad 80% ich eliminację. Należy podkreślić, że proces usuwania związków fenolowych zachodził wydajnie w szerokim zakresie pH i temperatury. Nie wykazano istotnego wpływu szybkości wstrząsania mieszaniny reakcyjnej oraz dodatku glikolu polietylenowego na przebieg procesu eliminacji związków ze ścieków.

Badania toksykologiczne wodnych roztworów fenolu w stężeniach od 1mM do 4 mM oraz 2,4-dichlorofenolu w stężeniach od 1 mM do 3 mM z użyciem *Lepidium sativum* wskazały na zwiększającą się toksyczność próbek wraz ze wzrostem w nich stężenia związków. We wszystkich przypadkach uzyskiwano natomiast istotne zmniejszenie toksyczności w próbkach zawierających roztwory poreakcyjne. Dane te w większości przypadków zostały potwierdzone w teście enzymatycznym MTT dla wodnych roztworów

2,4-dichlorofenolu. Wyniki te korespondują z uzyskanymi w badaniach nad eliminacją związków fenolowych z roztworów wodnych przez peroksydazy i wskazują ponadto, że podczas enzymatycznych przemian nie powstawały metabolity bardziej toksyczne od związków wyjściowych.

Przedstawione w dysertacji wyniki badań własnych zostały przez Doktorantkę odniesione do danych literaturowych i wnikliwie przedyskutowane.

Do najważniejszych, oryginalnych osiągnięć rozprawy doktorskiej należy zaliczyć:

- ✓ Wykazanie, że wycierka ziemniaczana i młóto jęczmienne jest źródłem peroksydaz o wysokiej aktywności oraz ustalenie wzorca izoenzymów szczególnie w ekstraktach młóta jęczmiennego wobec braku doniesień literaturowych na ten temat;
- ✓ Udowodnienie, że peroksydazy izolowane z wycierki ziemniaczanej i młóta jęczmiennego charakteryzowały się dużą stabilnością, lepszą od peroksydazy chrzanowej (HRP) immobilizowanej na monowarstwie kwasu 4-merkaptobenzoowego;
- ✓ Wykazanie, na podstawie wyników oznaczeń stężeń związków fenolowych w roztworach poreakcyjnych, że peroksydazy obecne w wycierce ziemniaczanej usuwały je z dużą wydajnością w szerokim zakresie pH i temperatury.
- ✓ Udowodnienie, że wraz z eliminacją fenoli z roztworów wodnych w wyniku działania peroksydaz następowało istotne obniżenie ich toksyczności.

### **Uwagi dyskusyjne i szczegółowe**

Zagłębiając się w szczegóły pracy doszukano się kilku elementów, które mogą być przedmiotem dyskusji:

1. Moje wątpliwości budzi użycie terminu „bioremediacja ścieków” w odniesieniu do badań zaprezentowanych w pracy. Termin ten zwykle jest używany do określania technologii usuwania zanieczyszczeń głównie z gleby i wód podziemnych.
2. Cel pracy w komentarzu Autorki w mojej ocenie powinien być sformułowany ogólnie w odniesieniu do całej dysertacji a przedstawione hipotezy/tezy stanowić jego uzupełnienie.
3. W pracy równolegle używane są terminy: ścieki przemysłowe i ścieki poprzemysłowe

(prawidłowe określenie to ścieki przemysłowe) oraz wodne roztwory fenolu 2,4 dichlorofenolu i ścieki syntetyczne. Używając tego drugiego określenia powinno się podać informację, jaki rodzaj ścieków one imitują i z jakiego źródła mogą pochodzić. Nie znalazłam takich danych, stąd uważam, że właściwe nazewnictwo próbek to wodne roztwory związków badanych. W pracy zabrakło również charakterystyki ścieków przemysłowych pochodzących z firmy Sohbi Craft Poland. Niewłaściwe jest również używanie terminu „ściek”.

4. W badaniach nad usuwaniem fenolu ze ścieków przemysłowych stwierdzono, że eliminacja związku w dużym stopniu była niezależna od aktywności peroksydaz i sugerowano, że może to być wynikiem adsorpcji tej substancji na powierzchni wycierki ziemniaczanej. Czy wskazywały na to także oznaczone stężenia fenolu w próbce kontrolnej (autoklawowanej), pozbawionej aktywności peroksoksydaz?
5. Stężenia fenolu w ściekach przemysłowych były w zakresie od 0,02 mM - 0,1 mM. Czy przy tak niskich wartościach zastosowano wystarczająco czułą metodę oznaczenia związku, biorąc pod uwagę sposób przygotowania krzywej kalibracyjnej?
6. Zarówno w komentarzu oraz w publikacji różnie definiowane jest kryterium oceny toksyczności w teście cytotoxycznosci MTT. W publikacji (str. 1063) to żywotność komórek i proliferacja, w komentarzu z kolei to funkcje biologiczne i biochemiczne komórek (str. 21). Proszę o zdefiniowanie mierzonego punktu końcowego reakcji testowej w teście MTT.
7. W komentarzu (str. 21) oraz w publikacji (str.1063) podane są sprzeczne definicje obliczonego IC50. Proszę o precyzyjne zdefiniowanie IC50 w teście MTT i wyjaśnienie, jaką metodą i na podstawie jakich danych obliczono ten parametr opisujący toksyczność próbek.
8. W teście MTT zastosowano różne jednostki do określenia stężenia roztworów i IC50. Utrudnia to analizę wyników. W tym przypadku wygodnym byłoby zastosowanie do interpretacji wyników jednostek toksyczności (TU).

Powyższe uwagi nie obniżają wartości merytorycznej rozprawy, którą oceniam w pełni pozytywnie. Realizacja pracy pozwoliła na wykazanie możliwości zastosowania odpadowej masy roślinnej zawierającej aktywne i stabilne peroksydazy do oczyszczania ścieków zawierających fenole. Szeroki zakres badań dotyczących biochemicznych właściwości

peroksydaz izolowanych z badanych odpadów roślinnych wpływa na dużą wartość poznawczą pracy. Doktorantka wykazała się umiejętnością rozwiązywania problemów badawczych z dziedziny fizjologii, chemii, biochemii i toksykologii. Uważam, że praca stanowi wartościowe osiągnięcie naukowe a jej treść kwalifikuję Panią mgr Katarzynę Kurnik do ubiegania się o stopień naukowy doktora.

### **Wniosek końcowy**

Stwierdzam, że praca pt: „**Biomasa odpadowa pochodzenia roślinnego jako źródło peroksydaz na potrzeby bioremediacji ścieków skażonych związkami fenolowymi**” spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki - Dz.U. Nr 65 poz. 595 wraz z późniejszymi zmianami i stawiam wniosek o dopuszczenie Pani **mgr Katarzyny Kurnik** do jej publicznej obrony przed Radą Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

H. Radziwiłł