

Wrocław, 30.06.2019r.

Dr hab. inż. Katarzyna Piekarska, prof. uczelni
Politechnika Wrocławska
Wydział Inżynierii Środowiska
Zakład Biologii Sanitarnej i Ekotechniki

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Justyny Drzymały
pt.: „Detoksykacja ścieków w oczyszczalni hydrofitowej”
opracowana na podstawie Uchwały Rady Wydziału Inżynierii Środowiska i
Energetyki Politechniki Śląskiej w Gliwicach z dnia 26 kwietnia 2019r.
Pismo *RIE-BD/4/427/2018/2019* Dziekana Wydziału
Pana Profesora Andrzeja Szłeka z dnia 17 maja 2019r.
(Promotr pracy: dr hab. inż. Joanna Kalka)

1. Zasadność doboru tematyki

W ostatnich latach coraz bardziej zwraca się uwagę na obecność drobnoustrojów lekoopornych we wszystkich elementach środowiska naturalnego. Drobnoustroje mogą nabywać oporność na drodze tzw. horyzontalnego transferu genów, który polega na przyjmowaniu genów oporności od innych organizmów. W dalszej kolejności mikroorganizmy mogą przekazywać geny następnym pokoleniom lub bakteriom należącym do innych, często niespokrewnionych gatunków. Szczególnie niebezpieczne są szczepy wykazujące oporność na więcej niż jeden chemioterapeutyk. Szczepy z nabytą cechą oporności na antybiotyki mogą być zagrożeniem dla zdrowia ludzkiego, ponieważ wykazują brak reakcji na leczenie, co skutkuje zwiększeniem zachorowalności i śmiertelności.

Do tego zjawiska przyczynia się powszechne stosowanie antybiotyków głównie w praktyce medycznej, weterynaryjnej oraz rolniczej. Tak więc wody powierzchniowe, ścieki oraz odcieki ze składowisk odpadów mogą stanowić główne źródło tych substancji. Większość farmaceutyków jest wydalana z organizmu ssaka w postaci metabolitów lub w postaci niezmienionej. Leki i ich pochodne to substancje wykazujące niejednokrotnie silne niekorzystne działanie toksyczne i/lub genotoksyczne na organizmy żywe zasiedlające środowiska wodno- glebowe. Nie pozostaje to bez wpływu na skuteczne usunięcie tej grupy związków ze ścieków surowych oczyszczanych metodami biologicznymi. Procesy te wykorzystują zjawisko biodegradacji lub biotransformacji przeprowadzane przez sztuczne biocenozy ukształtowane z drobnoustrojów naturalnie bytujących w środowiskach wodno- glebowych. Na skutek niekorzystnego działania farmaceutyków na mikroorganizmy formy przetworzone leków, jak i ich struktury pierwotne nie ulegają całkowitej redukcji

w procesach biologicznych. W ostateczności farmaceutyki wykazujące wyższe powinowactwo do fazy polarnej pozostają w ściekach oczyszczonych, natomiast leki mniej polarne mogą zostać zatrzymane w osadzie ściekowym. Tymi drogami substancje te przedostają się ponownie do ekosystemu wodnego i/lub lądowego. Leki i ich metabolity wykrywane są nie tylko w wodzie powierzchniowej i glebie, ale również w wodach podziemnych oraz w systemach dystrybucji wody przeznaczonej do spożycia.

Niezbędne jest więc stałe poszukiwanie nowych rozwiązań i/lub modyfikacja procesów i układów technologicznych już istniejących w celu usuwania tych niebezpiecznych mikrozanieczyszczeń, bowiem tradycyjne oczyszczalnie ścieków nie radzą sobie ze skutecznym usuwaniem substancji lekowych.

Z drugiej strony należy przeprowadzać badania bioindykacyjne chemioterapeutyków i ich pochodnych w celu stwierdzenia ich rzeczywistego działania na organizmy należące do różnych poziomów troficznych. Bowiem pełna analiza chemiczna zanieczyszczeń pojawiających się w środowisku przyrodniczym jest nierealna ze względu na złożoność ich składu oraz ze względu na wzajemne oddziaływania poszczególnych związków chemicznych w mieszaninie. Analiza chemiczna nie może więc być podstawą do prognozowania biologicznych skutków jakie mogą zanieczyszczenia wywołać w stosunku do ludzi i zwierząt. Stąd też istnieje konieczność zastosowania w kontroli jakości środowiska naturalnego badań bioindykacyjnych obok metod analitycznych, co jest postulowane również w odniesieniu do chemioterapeutyków. Jest to niezwykle ważne, bowiem zanieczyszczenie środowiska naturalnego farmaceutykami i ich pochodnymi jest problemem ogólnosiwiatowym i stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi i innych organizmów żywych.

To wszystko potwierdza aktualność i trafność wyboru tematyki rozprawy doktorskiej przez Panią mgr inż. Justynę Drzymałę i Jej promotora Panią dr hab. inż. Joannę Kalkę.

2. Charakterystyka pracy

Recenzowana praca, zawierająca łącznie 148 stron, ma typowy układ dla prac eksperymentalnych i składa się z wprowadzenia, trzech zasadniczych rozdziałów (części literaturowej, części badawczej, wyników i ich dyskusji), wniosków oraz bibliografii. Zawiera także spis rysunków (54 pozycje) i tabel (36 pozycji) oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Wykaz literatury to 380 pozycji, w większości prac opublikowanych w ostatnim dziesięcioleciu. Praca została także zaopatrzona w wykaz najważniejszych skrótów. ***Szkoda, że nie umieszczono tutaj wszystkich skrótów, którymi posługiwała się Autorka w pracy. Nie byłoby ich tak więcej, a ułatwiłoby to poruszanie się czytelnikowi po pracy. Tak samo brakuje rozszyfrowywania każdego skrótu w tekście, gdy pojawiał się on po raz pierwszy.***

W pierwszej- literaturowej części pracy, liczącej 18 stron, Doktorantka przedstawiła tło problemu związane z podstawowymi informacjami z piśmiennictwa naukowego dotyczącymi:

1. Farmaceutyków w środowisku naturalnym- ich źródeł oraz zagrożeń środowiskowych,
2. Metod usuwania mikrozanieczyszczeń z uwzględnieniem oczyszczalni hydrofitowych (w pracy zastosowano laboratoryjny model oczyszczalni hydrofitowej),
3. Charakterystyki diklofenaku i sulfametoksazolu- badanych w pracy wybranych modelowych substancji farmaceutycznych.

Przegląd pozycji literaturowych został przygotowany starannie. Część informacji przedstawiono w formie zestawień tabelarycznych. Ta forma prezentacji dotyczyła także toksyczności diklofenaku i sulfametoksazolu oraz ich mieszanin w stosunku do organizmów testowych należących do różnych poziomów troficznych środowiska wodno-łądowego oraz stopnia ich usuwania w różnych systemach oczyszczania ścieków. *Z tego wyboru piśmiennictwa, a także przekonującego sposobu jego prezentacji, Autorka wywiązała się bardzo dobrze.*

Część eksperymentalną rozprawy poprzedzają rozdziały *Teza pracy* i *Cel i zakres pracy*. Doktorantka na podstawie studiów literaturowych sformułowała **główną tezę pracy**: *W oczyszczalni hydrofitowej możliwa jest detoksykacja ścieków zawierających modelowe substancje farmaceutyczne, takie jak diklofenak i sulfametoksazol i dwie tezy cząstkowe: 1) Możliwe jest usunięcie substancji modelowych ze ścieków oczyszczanych metodą sztucznych mokradeł 2) Istnieje zależność pomiędzy parametrami fizykochemicznymi ścieków, a ich toksycznością* oraz sformułowany został **główny cel pracy**- *ocena detoksykacji ścieków pochodzących z oczyszczalni hydrofitowej usuwającej modelowe substancje farmaceutyczne, takie jak diklofenak i sulfametoksazol, jak również ocena właściwości ekotoksykologicznych tych związków oraz ich mieszaniny* - wraz z **zakresem pracy** przedstawionym na schemacie.

Dla osiągnięcia celu pracy Autorka przeprowadziła **badania w dwóch etapach**. W każdym z etapów wykorzystywała testy bioindykacyjne pozwalające zbadać rzeczywisty wpływ na wybrane organizmy testowe pochodzące z różnych poziomów troficznych środowiska wodno-gruntowego modelowych substancji farmaceutycznych diklofenaku i sulfametoksazolu i ich równowagowej mieszaniny (**etap I**) oraz ścieków surowych i oczyszczonych pobranych z laboratoryjnej oczyszczalni hydrofitowej oczyszczającej badane substancje (**etap II**).

Sposób przeprowadzenia badań i opracowania ich wyników omówiono w następnej części pracy (liczącej również 18 stron) w rozdziale: *Materiały i metody*.

Po szczegółowej analizie tego rozdziału i jego podrozdziałów stwierdzam, iż obszerne badania zostały zaplanowane w sposób prawidłowy oraz do ich wykonania dobrano właściwe metody badawcze i obliczeniowe.

Badania, jak już wspomniałam, podzielono na dwa etapy ze względu na przeprowadzane eksperymenty:

1. Pierwszy etap dotyczył badania toksyczności modelowych substancji farmaceutycznych diklofenaku i sulfametoksazolu oraz ich równowagowej mieszaniny z zastosowaniem pięciu testów krótkoterminowych: 1) testu inhibicji luminescencji bakterii *Vibrio fischeri* (test Microtox), 2) testu toksyczności ostrej z skorupiakami *Daphnia magna*, 3) testu inhibicji wzrostu rzęsy wodnej *Lemna minor*, 4) testu reprodukcji dżdżownic *Eisenia fetida*, 5) testu genotoksyczności względem komórek stożka wzrostu korzenia bobu *Vicia faba* oraz z zastosowaniem analizy aktywności dwóch enzymów antyoksydacyjnych: katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej w wybranych komórkach organizmów testowych (testy cytotoksyczności).
2. W drugim etapie badano toksyczność ścieków surowych (syntetyczne ścieki zawierające diklofenak i sulfametoksazol w stężeniach 2 mg/dm³ każdy) i oczyszczonych pozyskiwanych z laboratoryjnej oczyszczalni hydrofitowej o przepływie podpowierzchniowym pionowym. Badania prowadzono w dwóch układach. Każdy układ stanowiło 12 kolumn, gdzie połowa kolumn została obsadzona miskantem olbrzymim *Miscanthus giganteus*. Układy różniły się częstotliwością dozowania ścieków: w pierwszym układzie ścieki dozowano 2 razy w tygodniu po 2,5dm³ na dobę; w drugim układzie 5 razy w tygodniu po 1dm³ na dobę. Próbkę do badań toksykologicznych zaczęto pobierać po 8 tygodniach. Ponadto Doktorantka oznaczała w ściekach stężenia analizowanych farmaceutyków oraz stężenie azotu amonowego i całkowitego węgla organicznego (TOC) w ściekach.

Zebrane dane Doktorantka poddała podstawowej analizie statystycznej oraz wyznaczała korelacje pomiędzy wartościami uzyskanych parametrów. Ponadto, korzystając z różnych wytycznych, dokonała klasyfikacji toksyczności badanych substancji na podstawie wartości EC₅₀/IC₅₀ oraz TU, wyznaczyła stężenia niebezpieczne dla 5% gatunków (HC₅), określiła ryzyko środowiskowe RQ oraz określała rodzaj interakcji zachodzących w mieszaninie badanych farmaceutyków.

Zasadniczą część pracy stanowią trzy kolejne rozdziały, liczące 65 stron, w których przedstawiono **Wyniki, Dyskusję wyników oraz Wnioski**. Na potrzeby omówienia wyników bogaty materiał eksperymentalny został zebrany w tabelach i przedstawiony na rysunkach. Każdy podrozdział został zaopatrzony w krótki komentarz dotyczący uzyskanych wyników. Następnie uzyskane wyniki badań Doktorantka zestawiała z wynikami badań innych autorów. Z kolei w ostatnim rozdziale zatytułowanym **Wnioski**, Pani mgr inż. Justyna Drzymała przedstawiła najważniejsze rezultaty swoich badań oraz wynikające z nich prawidłowości.

3. Ocena rozprawy

Tak jak wspomniałam na początku, podjęty przez Doktorantkę problem jest bardzo istotny i aktualny, bowiem dotyczy jakości środowiska wodno- lądowego w kontekście obserwowanego od lat wzrostu stężeń substancji farmaceutycznych w tych przedziałach.

Do badań Pani mgr inż. Justyna Drzymała wybrała diklofenak, należący do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Lek ten wykazuje również działanie przeciwbólowe i przeciwgorączkowe i jest dostępny bez recepty. Jego działanie polega na hamowaniu aktywności cyklooksygenazy, enzymu odpowiedzialnego za syntezę prostanoidów wytwarzanych podczas stanów zapalnych. Diklofenak znalazł się na liście 10 substancji lub grup substancji, które wykazują znaczne ryzyko względem środowiska wodnego. W 2013r. wszystkie państwa członkowskie UE, zgodnie z odpowiednią dyrektywą PEiRE (2013/39/UE), zostały zobligowane do monitorowania każdej substancji znajdującej się na liście obserwacyjnej przez okres co najmniej 12 miesięcy w wybranych stacjach monitorowania. Drugim lekiem wybranym do badań był sulfametoksazol, antybiotyk z grupy sulfonamidów o szerokim spektrum działania, stosowany w terapii ludzi i zwierząt, przeciw bakteriom gram-dodatnim i gram-ujemnym oraz stosowany w infekcjach pierwotniaków i grzybów.

Doktorantka opisała w sposób poprawny właściwości fizykochemiczne obu farmaceutyków oraz toksyczność tych związków i ich mieszanin w stosunku do organizmów wodnych, zarówno w części literaturowej jak i w rozdziale Materiały i metody. Brakuje mi jednak przekonującego wyводу dlaczego wybór padł właśnie na te związki chemiczne?

Wobec wzrastającego stężenia chemioterapeutyków we wszystkich przedziałach środowiska naturalnego koniecznym staje się także ich skuteczne usuwanie w procesach oczyszczania ścieków. Tym bardziej iż związki chemiczne występują w środowisku w mieszaninach i często obserwujemy interakcje między nimi. Często obserwuje się efekt zwiększenia toksyczności mieszaniny farmaceutyków i ich metabolitów w porównaniu do pojedynczych związków. Wobec tego iż konwencjonalne metody oczyszczania (np. metoda osadu czynnego) nie radzą sobie z usuwaniem takich zanieczyszczeń Doktorantka skupiła swoje badania na wykorzystaniu laboratoryjnego modelu oczyszczalni hydrofitowej o przepływie podpowierzchniowym pionowym w obecności popularnie hodowanej w Polsce trawy- miskanta olbrzymiego *Miscanthus giganteus*. Stanowiska nieobsadzone tą rośliną działały na zasadzie filtru glebowego wzbogaconego drobnoustrojami występującymi w glebie ogrodowej zastosowanej w badaniach.

Tak jak poprzednio zabrakło mi wyraźnego uzasadnienia dlaczego wybór padł na taką technologię oczyszczania ścieków i zastosowaną roślinę. Doktorantka podała jedynie w tabeli 10 zestawienie danych literaturowych dotyczących stopnia usuwania wybranych do badań farmaceutyków bez większego komentarza. Nie znane są także stężenia oczyszczanych związków ponieważ dane są podane w %. W pracy nie znalazłam również stężeń środowiskowych badanych substancji. Jakie były przesłanki

stosowanych stężeń diklofenaku i sulfametoksazolu na poziomie 2 mg/dm³ każdy oraz stężeń tych związków i ich mieszaniny w badaniach modelowych? W tym miejscu rekomendowałabym także, np. w przyszłych publikacjach, stosowanie nomenklatury związanej z układem jednostek SI.

Osiągnięcie postawionego celu i udowodnienie tez wymagało realizacji dużego zakresu pracy, co wiązało się z przeprowadzeniem skomplikowanych i pracochłonnych prac doświadczalnych. Pod względem merytorycznym praca nie budzi zastrzeżeń. Zakres doświadczeń został zaplanowany prawidłowo, odpowiednio do celu pracy. Interpretacja wyników eksperymentów i ich opis świadczą o umiejętności rozwiązywania przez Doktorantkę problemów badawczych. Z wykonanych badań, autorka wysunęła logiczne wnioski, które potwierdzają również, iż cele pracy zostały zrealizowane. *Nie zostało to jednak jednoznacznie podkreślone na końcu pracy, ponieważ dysertację kończy 15 bardzo szczegółowych wniosków. Ten opis mógłby się znaleźć np. w krótkim podsumowaniu, a wnioski powinny się odnieść jedynie do najważniejszych konkluzji/ osiągnięć Doktorantki.*

Do osiągnięć Doktorantki, poza potwierdzeniem tezy postawionej na początku pracy, wynikających z przeprowadzonych badań należy zaliczyć:

- potwierdzenie, iż same analizy fizykochemiczne ścieków nie dają pełnego obrazu rzeczywistego ich oddziaływania na organizmy żywe środowiska wodno-glebowego, stąd istnieje konieczność wprowadzenia badań bioindykacyjnych do oceny „pracy” oczyszczalni ścieków,
- zwrócenie uwagi na to, iż na badane parametry fizykochemiczne (TOC, azot amonowy) największy wpływ miało stężenie badanych farmaceutyków w ściekach syntetycznych oraz częstotliwość ich dozowania, co przekładało się na właściwości ekotoksykologiczne ścieków oczyszczonych,
- zwrócenie uwagi na to, iż znajomość wartości TOC i azotu amonowego może pomóc w oszacowaniu toksyczności badanych próbek. Możliwe jest wtedy takie dobranie stężeń badanych farmaceutyków w oczyszczanych ściekach aby nie wpływały one niekorzystnie na wybrane bioindykatory charakterystyczne dla środowiska wodno-glebowego,
- wytypowanie najlepszych bioindykatorów (*Daphnia magna*, *Lemna minor*, *Vicia faba* i *Eisenia fetida*) do oceny procesu detoksykacji ścieków zawierających badane farmaceutyki, czyli diklofenak i sulfametoksazol,
- wprowadzenie do badań bioindykacyjnych analizy aktywności enzymów antyoksydacyjnych (katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej) jako wskaźnika stresu środowiskowego,
- wprowadzenie stężenia niebezpiecznego dla 5% gatunków (HC₅) do opracowywania wyników badań bioindykacyjnych, na podstawie którego można było określić, że diklofenak wykazuje wysokie ryzyko środowiskowe, podczas gdy sulfametoksazol charakteryzuje się niskim zagrożeniem dla biocenoz wodnych. Wskaźnik ten okazał się także pomocny w określaniu zmian właściwości toksycznych ścieków w trakcie procesu ich oczyszczania,

- zwrócenie uwagi na korzystne działanie obecności trawy *Miscanthus giganteus* na zjawisko detoksykacji ścieków zawierających badane substancje chemiczne,

Na podkreślenie zasługuje także fakt zebrania bardzo obszernej bazy danych, które mogą jeszcze posłużyć do opracowania metodyki oczyszczania oraz badań bioindykacyjnych ścieków zawierających substancje farmaceutyczne, bowiem jak sama Autorka pisze ścieki takie nie powinny być odprowadzane do oczyszczalni komunalnych bez wstępnego podczyszczenia. Jak również przedstawione w pracy dane mogą posłużyć do obliczeń jeszcze innych, ciekawych zależności w przyszłości lub mogą stanowić punkt wyjścia do planowania następnych eksperymentów. *Jestem ciekawa czy Autorka dysertacji myśli już o wykorzystaniu badań w praktyce?*

Rozprawa doktorska jest dobrze zredagowana, tekst napisany jest poprawnym językiem, bez naleciałości żargonowych. Materiał graficzny i tabelaryczny jest czytelny. Literówki, czy błędy stylistyczne nie zmniejszają w sposób istotny merytorycznej wartości przeprowadzonych badań o charakterze poznawczym. Większość zawartych w pracy wyników pomiarowych zasługuje na publikację.

4. Wniosek końcowy

Podsumowując moją opinię stwierdzam, że recenzowaną dysertację Pani mgr inż. Justyny Drzymały pt.: „Detoksykacja ścieków w oczyszczalni hydrofitowej” uważam za spełniającą ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Przedstawione w niej badania wpisują się w dyscyplinę „inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka” (wg klasyfikacji określonej w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 20 września 2018 r. w sprawie dziedzin i dyscyplin naukowych i artystycznych (Dz. U. z dnia 25 września 2018 r. poz.1818)). Opiniowana praca spełnia wymagania artykułu 13. ustęp. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie (Dz. U. z dnia 27.09.2017 r., poz. 1789).

Wobec tego przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Wydziału Inżynierii Środowiska i Energetyki Politechniki Śląskiej w Gliwicach wniosek o przyjęcie opiniowanej rozprawy i dopuszczenie Autorki do publicznej obrony pracy doktorskiej.

