



POLITECHNIKA POZNAŃSKA
INSTYTUT TECHNOLOGII I INŻYNIERII CHEMICZNEJ
Berdychowo 4, 60-965 Poznań
tel. 61 665-37-16, fax 61 665 36 49
e-mail: lukasz.chrzanowski@put.poznan.pl
prof. dr hab. inż. Łukasz Chrzanowski
Zakład Chemii Organicznej



Poznań, 13.11.2024

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandra de Rosset
pt. „Pozyskiwanie i wykorzystanie biosurfaktantów z olejów odpadowych pochodzących z przemysłu spożywczego w mikrobiologicznych ogniwach paliwowych”

Oceniana praca doktorska została zrealizowana w Katedrze Inżynierii Procesowej i Technologii Materiałów Polimerowych i Węglowych, na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej, pod kierunkiem promotora dr hab. inż. Grzegorza Pasternaka, prof. PWr.

Podstawa wykonania recenzji

Recenzję wykonałem w oparciu o decyzję Rady Naukowej Dyscypliny Naukowej Inżynierii Chemicznej Politechniki Wrocławskiej z dnia 16 października 2024, a także pisma Przewodniczącej w. w. Rady, prof. dr hab. inż. Izabeli Michalak z dnia 21 października 2024 roku oraz dostarczonego egzemplarza pracy doktorskiej.

Charakterystyka tematyki pracy doktorskiej

Substancje posiadające zdolności do zmniejszania napięcia powierzchniowego pochodzenia biologicznego były znane od stosunkowo długiego czasu, jednak dopiero rozwój technik analitycznych pozwolił na błyskawiczny wzrost zainteresowania tą grupą związków. Szybko okazało się, że możliwe jest wyizolowanie zdefiniowanych cząsteczek, które swoją budową odpowiadały związkom powierzchniowo-czynnym nazywanym popularnie surfaktantami. Aby podkreślić ich pochodzenie wprowadzono przedrostek „bio”, który z początku sugerował tylko produkcję przez mikroorganizmy, a później do tej grupy włączono również analogiczne związki produkowane przez rośliny. Klasycznym, wręcz wzorcowym przykładem są ramnolipidy wytwarzane przez szczepy Gram-ujemnej bakterii *Pseudomonas aeruginosa* lub surfaktyna wydzielana przez Gram-dodanie szczepy *Bacillus subtilis* lub saponiny pochodzenia roślinnego. Błyskawicznie zyskały zainteresowanie świata naukowego i od końcówki lat 80-tych XX wieku lawino wzrastała liczba publikacji poświęconych biosurfaktantom. Z początku koncentrowano się na izolacji mikroorganizmów zdolnych do produkcji biosurfaktantów z wykorzystaniem różnych źródeł węgla, wydzieleniu ich z medium hodowlanego oraz charakterystyce. Następnie przyszedł czas na wykorzystywanie biosurfaktantów w szeroko pojętych procesach degradacji węglowodorów i mikrobiologicznego oczyszczania środowiska z produktów ropopochodnych oraz metali ciężkich. Stopniowo rozszerzano badania o procesy Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR), podejmując próby wykorzystania biosurfaktantów praktycznie w każdej dziedzinie. Opisywane wyniki sugerowały niekończące się zalety biosurfaktantów, co przełożyło się na sformułowanie wniosków, że biosurfaktanty są mniej toksyczne niż ich syntetyczne odpowiedniki. Dalszą konsekwencją były postulaty aby biosurfaktanty zastąpiły syntetyczne związki powierzchniowo-czynne, które z definicji stały się toksyczne, trudno degradowalne i pozbawione jakichkolwiek zalet. Na przeszkodzie stanęła tylko kwestia wydajności produkcji biosurfaktantów, która przy zastosowaniu klasycznych metod biotechnologicznych jest niewielka i nieporównywalna z efektywnością biosyntezy kwasu cytrynowego, alkoholu etylowego czy innych tego typu związków produkowanych na masową skalę przez mikroorganizmy. W konsekwencji niewielkie ilości biosurfaktantów, będących wtórnymi metabolitami, muszą być wydzielane z medium hodowlanego, co przekłada się na duże koszty. Tutaj pojawia się pierwszy problem, gdyż sugerowana przez wielu autorów cena wytwarzania biosurfaktantów na poziomie 5-20\$ dolarów za kilogram,

jest nierealna biorąc pod uwagę koszty masowej produkcji innych biocząstek wytwarzanych w stężeniach większych o rząd czy dwa rzędy wielkości. Drugim problemem jest wykorzystanie niektórych mikroorganizmów produkujących biosurfaktanty, co w przypadku patogenów takich jak *Pseudomonas aeruginosa* będzie trudne do zaakceptowania przez większość instytucji odpowiedzialnych za ochronę zdrowia. To również przekłada się na potencjalne ograniczenie możliwości zastosowania finalnego produktu, który będzie musiał posiadać wysoką czystość i stosowne certyfikaty dopuszczenia na rynek. Natomiast próby wykorzystania genów odpowiedzialnych za produkcję rhamnolipidów i ich wprowadzenia do niepatogennych szczepów nie przełożyły się na wydajności porównywalne dla macierzystej bakterii.

W konsekwencji w chwili obecnej produkcja biosurfaktantów jest bardzo droga i ograniczona do kilku preparatów, które znajdują zastosowanie w dziedzinach charakteryzujących się dużą stopą zwrotu, a więc kosmetyce, farmacji itp. Szanse masowego wykorzystania biosurfaktantów raczej się oddalają niż przybliżają. Ponadto warto zwrócić uwagę na dwie niezmiernie istotne kwestie. Surfaktanty syntetyczne są zdecydowanie bardziej projektowalne pod kątem budowy cząsteczki, a powszechne wykorzystanie substratów pochodzenia biologicznego, oraz ogromny wzrost świadomości ekologicznej, spowodował, że obecnie stosowane surfaktanty syntetyczne są w większości biodegradowalne, cechują się ogromnie zmniejszoną toksycznością oraz przede wszystkim są dużo tańsze i łatwiej dostępne. Poza tym syntetyczne surfaktanty zdecydowanie lepiej zmniejszają napięcie powierzchniowe i mogą być bardziej odporne na czynniki fizyko-chemiczne.

Ponadto wiele szczegółowych badań nad rolą biosurfaktantów w procesach zwiększania mobilności, kolonizacji i zdobywaniu nowych nisz środowiskowych przez produkujące je mikroorganizmy znacząco zwiększyło stan naszej wiedzy. Obecnie coraz świadomiej dostrzegamy w nich związki wpływające na komunikację międzygatunkową (tzw. Quorum sensing) czy pozwalające na dominację nisz przez patogenne warunki, przy skutecznym zmniejszeniu wzrostu lub nawet eliminacji innych konkurencyjnych gatunków. Niesamowity rozwój technik molekularnych przyczynił się do zdecydowanie lepszego zrozumienia bardzo skomplikowanych ról biosurfaktantów w funkcjonowaniu mikroorganizmów w środowisku czy podczas zakażeń szpitalnych.

Tematyka badawcza podjęta przez Pana mgr Aleksandra de Rosset doskonale wpisuje się w światowe trendy badawcze, wśród których wiodącą rolę odgrywają mikrobiologiczne ogniwa paliwowe. Ponieważ klasyczne metody zwiększania produkcji biosurfaktantów okazały się ślepy m zaułkiem, wykorzystanie MFC stanowi niewątpliwie nowość naukową i może przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów odpowiedzialnych za wydajniejsze wytwarzanie związków powierzchniowo-czynnych pochodzenia naturalnego.

Niniejsza praca doktorska bez wątpienia wnosi elementy nowości naukowej do obecnego stanu wiedzy i jak już wspomniano, dobrze wpisuje się w kierunki badawcze realizowane przez zagraniczne ośrodki naukowe.

Formalna ocena pracy doktorskiej

Praca doktorska Pana mgr inż. Aleksandra de Rosset została zrealizowana i przedstawiona jako cykl czterech spójnych tematycznie prac doświadczalnych:

- **A. de Rosset**, P. Rutkowski, G. Pasternak, “The effect of surface and porous structure on long-term performance of carbon powder cathodes without binder, during 300-day trial in microbial fuel cells” *Sustain. Energy Technol. Assessments*, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.seta.2023.103340>, IF₂₀₂₃=8.0, 140 pkt.
- G. Pasternak, **A. de Rosset**, P. Rutkowski, “Horizontal microbial fuel cell system producing biosurfactants in response to current generation from waste cooking oil as a fuel” *Energy Convers. Manag.*, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2023.116807>, IF₂₀₂₃=10.4, 200 pkt.
- **A. de Rosset**, N. Tyszkiewicz, J. Wiśniewski, N. Pudełko-Malik, P. Rutkowski, P. Młynarz, G. Pasternak “Bioelectrochemical synthesis of rhamnolipids and energy production and its correlation with nitrogen in air-cathode microbial fuel cells” *J. Environ. Manage.*, 2024, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.121514>, IF₂₀₂₃=8.0, 200 pkt.

- **A. de Rosset**, F. Yalcinkaya, J. Wolska, S. Waclawek, G. Pasternak “Enhancing performance and durability of PVDF-ceramic composite membranes in microbial fuel cells using natural rhamnolipids” J. Power Sources, 2024, <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2024.235257>, IF₂₀₂₃=8.1, 140 pkt.

Wszystkie cztery prace zostały już opublikowane w czasopismach bardzo dobrze rozpoznawalnych wśród naukowców zajmujących się zagadnieniami związanymi z MFC. Trzy z nich cieszą się również bardzo dobrą opinią w środowisku elektrochemików, natomiast JEMA jest doskonale rozpoznawalna w tematyce środowiskowej.

W szczególności sposób należy podkreślić, że w trzech pracach Doktorant jest pierwszym autorem, a to zwyczajowo odpowiada roli osoby wykonującej większość badań laboratoryjnych, natomiast w jednej jest drugim autorem.

Należy podkreślić, że niniejsza rozprawa doktorska jest oparta na bardzo czytelnym zbiorze opublikowanych artykułów, które jasno określają zakres pracy Doktoranta. Liczba artykułów odpowiada również średniej liczbie artykułów podobnych prac doktorskich w międzynarodowym środowisku naukowym i jest w 100% adekwatna do specyfiki prowadzonych badań. Pragnę podkreślić, że jest to bardzo dobrze przygotowana rozprawa w formie zbioru publikacji.

Układ pracy jest dość typowy dla doktoratów tego typu. Całość pracy zawarto na 104 stronach. Po stronie tytułowej zamieszczono stronę z podziękowaniami dla Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej NAWA – program „Polskie Powroty 2018” oraz Narodowego Centrum Nauki – projekt OPUS 33 „Mechanizmy bioelektrochemicznej transformacji materiałów odpadowych z przemysłu naftowego do biosurfaktantów”. W tego typu informacjach zawsze warto wskazać beneficjenta obu tych bardzo ważnych źródeł finansowania gdyż pozyskanie środków jest kluczowe dla prowadzenia własnych badań i rozwoju zespołu badawczego promotora.

Dwie kolejne strony zajmuje spis treści, po czym zawarto dwustronicowe streszczenie w języku polskim oraz jego dwustronicowy odpowiednik w języku angielskim. Na stronach 9-28 znajduje się przegląd literaturowy, a po nim przedstawiono cel i zakres pracy. Dalej na stronach 30-34 umieszczono syntetyczny opis wykorzystywanych metod, po czym płynnie zestawiono spis cytowanych prac. Od strony 43 rozpoczyna się opis pierwszej publikacji. Autor stosuje układ, w którym najpierw pojawia się zwięzły opis publikacji w języku polskim, po czym następuje prezentacja oryginalnej wersji publikacji a po niej w zależności od potrzeby umieszczono dodatkowe informacje w formie ESI. Na stronie 100-101 zawarto dwustronicowe podsumowanie wraz z wnioskami. Kolejne trzy strony to spis dorobku naukowego Doktoranta.

Nie zamieszczono tradycyjnych oświadczeń współautorów dotyczących szacowanego udziału w opisywanych publikacjach, choć w każdej pracy znajduje się CRediT authorship contribution statement. Warto aby tego rodzaju podział był jednak bardziej szczegółowy i jednoznacznie pokazywał rolę poszczególnych autorów w kluczowych badaniach itp.

Po zwięzłym wprowadzeniu do tematyki badawczej autor umieścił cele pracy, w ramach których trafnie wyodrębnił następujące zadania badawcze:

- dobór materiałów funkcjonalnych dla MFC wykorzystywanego do produkcji biosurfaktantów i energii elektrycznej
- opracowanie konstrukcji MFC zdolnego do wydajnej konwersji zużytego oleju roślinnego do biosurfaktantów
- charakterystyka reakcji bioelektrochemicznych prowadzących do produkcji biosurfaktantów w MFC ze zużytego oleju roślinnego
- optymalizacja składu pożywki zasilającej MFC pod kątem produkcji biosurfaktantów i energii elektrycznej

- identyfikacja i ilościowe określenie produkowanych biosurfaktantów
- wykorzystanie biosurfaktantów w celu zwiększenia wydajności MFC.

Warto podkreślić, że wszystkie zadania zaplanowano w spójny sposób a ich prawidłowa realizacja powinna udzielić odpowiedzi na podstawowe pytanie postawione we wprowadzeniu, a dotyczące możliwości produkcji biosurfaktantów z dużą efektywnością.

Ocena merytoryczna pracy doktorskiej

Podany w doktoracie cel badań jest czytelny i bardzo dobrze nawiązuje do zapotrzebowania rynku na nowe metody produkcji biosurfaktantów. Stąd wszelkie badania zwiększające obecny stan wiedzy są bardzo ważne i pożądane zarówno przez środowisko naukowe ale również przez komercyjnych użytkowników.

Doktorant sprawnie przedstawił obecny stan wiedzy w zakresie podstaw i wykorzystania MFC. W części poświęconej biosurfaktantom nieświadomie wpadł w pułapkę hurra-optimistycznych publikacji, co pragnę podkreślić bardzo wyraźnie, nie jest jego winą. Pomimo przełomowych prac w tej tematyce, prominentni badacze od lat lansują wizję biosurfaktantów jako jedynej słusznej koncepcji, wykorzystując do tego celu każdą nadarzącą się okazję jak ptasia grypa, Covid, energetykę nuklearną, produkcję metali ziem rzadkich itp. Niestety nie dostrzegają przełomowych prac biotechnologicznych czy z obszaru nauk medycznych, które rzucają nowe światło na produkcję oraz przede wszystkim rolę biosurfaktantów w funkcjonowaniu produkujących je bakterii. Najlepszym dowodem jest fakt, że od lat 90-tych XX wieku do chwili obecnej żaden biosurfaktant nie jest produkowany na masową skalę, porównywalną z surfaktantami syntetycznymi, oraz w żadnej dziedzinie biosurfaktanty nie wyparły swoich syntetycznych odpowiedników. Argumenty o mniejszej toksyczności, biodegradowalności i setek innych zalet zostały doskonale zweryfikowane przez wiele wiarygodnych ośrodków naukowych. Syntetyczne surfaktanty dostosowały się do wymagań konsumentów, stały się biodegradowalne, bazują na odnawialnych substratach itp. a przede wszystkim są co najmniej o rząd wielkości tańsze.

Pomimo oczywistych dowodów zarówno w postaci publikacji jak i obecnych realiów produkcji (bio)surfaktantów, wielu rozpoznawalnych w tematyce biosurfaktantów naukowców nie dostrzega jak ogromnym zmianom uległa nasza wiedza od lat 90-tych ubiegłego wieku. Niestety nadal publikowane są ich prace przeglądowe, które nie tylko powtarzają te same informacje co w latach 90-tych, a obecnie skutecznie zniekształcają stan wiedzy i rozprzestrzeniają fałszywy obraz biosurfaktantów wśród młodych naukowców. Dlatego pragnę szczególnie podkreślić, że w żadnym miejscu nie należy mieć pretensji ani do Doktoranta ani do Promotora. Biosurfaktanty posiadają z pewnością pewne cechy, które zdecydowanie mogą być unikalne i warte są wykorzystania w dobrze dobranych do tego celu zastosowaniach. Stąd też warto prowadzić dalsze badania i rozwijać obecny stan wiedzy. Z tego punktu widzenia niniejsza praca doktorska wpisuje się dobrze w taką strategię. Przede wszystkim zrozumienie procesów zachodzących w MFC jest kluczowe aby zdecydowanie lepiej i skuteczniej wykorzystać potencjał natury do pozyskania energii, kontrolowania procesów biotechnologicznych czy związanego z tym projektowania czujników nowej generacji. Tego typu badania są szczególnie interesujące dla środowiska naukowego i wpisują się w tematykę badawczą realizowaną przez znane międzynarodowe ośrodki badawcze.

Zaplanowane przez Doktoranta, wspólnie z promotorem, eksperymenty nie są odtwórcze i eksplorują bardzo istotny obszar badawczy. Zaprezentowane wyniki badań wnoszą elementy nowości naukowej i nawet jeśli mogą być momentami dyskusyjne, to nadal pozwalają na lepsze i pełniejsze zrozumienie mechanizmów funkcjonowania bakterii degradujących hydrofobowe substraty i roli związków powierzchniowo-czynnych pochodzenia mikrobiologicznego.

Szczegółowa analiza załączonych prac badawczych wraz z autorskim komentarzem Doktoranta, nasunęła Recenzentowi pewne komentarze, sugestie i pytania:

- strona 15 - „konsorcja mikrobiologiczne” wraz z późniejszymi zastosowaniami w publikacjach – warto sprawdzić opis kultur mieszanych, społeczności mikrobiologicznych czy konsorcjów przedstawiony na str. 101-103 **Cultivation of Microbial Consortia and Communities**, Wolfaardt

i wsp., **Manual of Environmental Microbiology**, Third edition, ASM Press, Washington 2007, USA. Ta definicja oraz inne wyjaśnienia w przywołanym tekście źródłowym (strony 101-103) zdecydowanie nie pozwalają nazwać stosowanych układów mikroorganizmów konsorcjami (microbial consortia) a jasno definiują je jako społeczności (microbial community). Osad czynny jest typową społecznością, w której mogą występować konsorcja, ale nie jest to warunkiem kluczowym. W ramach adaptacji z osadu mogą być wyeliminowane pewne grupy mikroorganizmów, a osad nadal będzie właściwie funkcjonował. W obrębie konsorcjum wyeliminowanie jednego mikroorganizmu pociąga za sobą rozpad całości, gdyż relacje pomiędzy mikroorganizmami warunkują przetrwanie całości. Błędne nazewnictwo jest niestety rozpowszechnione do tego stopnia, że średnio w co trzeciej publikacji stosowane są niepoprawne nazwy.

- strona 15 - „stopień rozkładu” – zdecydowanie lepiej wykorzystywać określenie efektywność rozkładu czy biodegradacji.
- strona 19 - „Większość biosurfaktantów ma niższe CMC, napięcia powierzchniowego i napięcia międzyfazowego w porównaniu do ich syntetycznych odpowiedników, co czyni je bardziej wydajnymi i skutecznymi w podobnych zastosowaniach” – źródło tej informacji jest doskonale znane [62] jednak jest to informacja diametralnie odmienna od rzeczywistości. Syntetyczne surfaktanty są w zdecydowanej większości bardziej skuteczne i lepiej obniżają napięcie powierzchniowe. Podobnie jak dalsza część: „Ponadto syntetyczne środki powierzchniowo czynne pochodzące z przemysłu petrochemicznego są toksyczne i mogą powodować szkody dla ekosystemów, a ich produkcja jest sprzeczna z celami zrównoważonego rozwoju [62]. Są to niestety słowa bez pokrycia gdyż przykładowo standardowe i wręcz referencyjne rhamnolipidy są doskonale znane z promowania wirulentności i rozwoju patogennych bakterii, które je produkują. Przykładowo:

- Rhamnolipids Are Virulence Factors That Promote Early Infiltration of Primary Human Airway Epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*
- Cytotoxic rhamnolipid micelles drive acute virulence in *Pseudomonas aeruginosa*

Takich publikacji są setki i bez trudu można dostrzec, że skoro rhamnolipidy są produkowane przez patogenne szczepy *Pseudomonas aeruginosa* to można spodziewać się problemów przy masowym wykorzystaniu tego biosurfaktanta. Zasady zielonej chemii nakazują również najlepsze wykorzystanie substratów, a rhamnolipidy będące tzw. „secondary metabolites” nigdy nie będą głównym produktem. Z definicji oznacza to niską wydajność produkcji i konieczność izolacji z mieszanin hodowlanych, zagospodarowania odpadowej biomasy itp. W przypadku patogenów, koszty bezpiecznej utylizacji będą ogromne, stąd sugestie autorów pracy [62] są w zdecydowanej większości życzeniowe i nieoparte obecnym stanem wiedzy w dziedzinie biosurfaktantów. Warto aby Doktorant zapoznał się z innymi publikacjami w tej tematyce np.:

- Why do microorganisms produce rhamnolipids?
- Microbial Degradation of Hydrocarbons-Basic Principles for Bioremediation: A Review
- Basic principles for biosurfactant-assisted (bio)remediation of soils contaminated by heavy metals and petroleum hydrocarbons – A critical evaluation of the performance of rhamnolipids

oraz wypracował własną opinię w oparciu o prace zarówno popierające jak i kwestionujące typowe i często nadużywane zalety biosurfaktantów.

- strona 19 – Rysunek 5. Charakterystyka zmian napięcia powierzchniowego w funkcji stężenia biosurfaktantów. Ponieważ w większości publikacji Doktorant odwołuje się do napięcia powierzchniowego i biosurfaktantów warto bardzo dokładnie przeanalizować ten wykres. Niezależnie czy będziemy opisywać biosurfaktant czy surfaktant syntetyczny, wykres zmian napięcia będzie wyglądać analogicznie. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że jest to układ modelowy oparty na czystej wodzie, który nie uwzględnia adsorpcji surfaktantu na ściankach naczyń, elektrodach, komórkach bakteryjnych zarówno w formie planktonowej jak i tych budujących biofilm itp. Oznacza to, że w praktyce stężenie musi być większe niż hipotetycznie CMC aby zaobserwować powstawanie micel. Jest to szczególnie widoczne w środowisku

glebowym, gdzie micelle ramnolipidów obserwuje się średnio w stężeniu 5 x CMC w układzie modelowym. Dla typowych, dobrze zdefiniowanych mieszanin mono i di-ramnolipidów wartość CMC w układzie modelowym osiąga się przy stężeniu w zakresie 50-80 mg/L a napięcie powierzchniowe zawiera się wtedy w zakresie 26-32 mN/m. Do tego wykresu i pokazanych wartości będą się odwoływać w następujących komentarzach.

- strony 21-25 - „Zastosowanie biosurfaktantów w remediacji węglowodorów, ma na celu zwiększenie ich biodostępności dla mikroorganizmów” itp. Węglowodory są hydrofobowe i przedostają się przez membranę komórkową na zasadzie transportu pasywnego. Wnętrze membrany jest hydrofobowe, a typowe bakterie degradujące węglowodory nie potrzebują surfaktantów aby pozyskać hydrofobowe substraty, a wprost przeciwnie posiadają doskonały system tzw. "efflux pump", które wyrzucają na zewnątrz nadmiarowe węglowodory z membrany zewnętrznej, przestrzeni periplazmatycznej czy membrany wewnętrznej (dla bakterii Gram-ujemnych) aby stężenie węglowodorów w komórkach było bezpieczne dla procesów zachodzących w cytozolu. Ekstremalnymi bakteriami nie są nawet te, które degradują ropę naftową w złożach (skład ropy zależy w dużym stopniu od aktywności tych mikroorganizmów) ale te, które są odpowiedzialne za korozję zbiorników paliw na stacjach paliw. Typowy olej napędowy wymaga wprowadzania biocydów, gdyż inaczej rozwój mikroorganizmów na granicy faz paliwo/skroplona w zbiorniku woda jest odpowiedzialny za wytwarzanie biofilmów, który w przypadku przedostania się do układów paliwowych może doprowadzić do usterek. Występujące na dnie warunki beztlenowe z kolei przyczyniają się do korozji mikrobiologicznej i perforowaniu zbiorników. Warto również wspomnieć, że wprowadzenie biokomponentów wymusza dodatkowe wprowadzanie takich substancji hamujących rozwój mikroorganizmów. Problemem podczas degradacji węglowodorów w 99% nie jest dostępność źródła węgla, ale fakt, że tego źródła węgla jest bardzo dużo a brakuje odpowiednich ilości azotu, fosforu oraz innych kluczowych mikroelementów. To zagadnienie zostało doskonale opisane podczas badań dotyczących zakwitania po wyciekach ropy naftowej, podczas których następuje błyskawiczny wzrost biomasy degradującej węglowodory po czym następuje stagnacja. Wprowadzane wtedy surfaktanty powodują lepsze rozprowadzenie ropopochodnych, rozwijają powierzchnie, a jednocześnie zwiększa się relatywna dostępność N i P. Ponadto typowe preparaty do tego celu oprócz surfaktantów zawierają dodatkowe źródło N i P. Co więcej, powszechnie znane zwiększanie produkcji biosurfaktantów w przypadku braku wystarczającej ilości N, P lub innych mikroelementów doskonale pokazuje rolę biosurfaktantów, dzięki którym komórki żyjące w biofilmie zyskują mobilność i mogą kolonizować nowe nisze środowiskowe bogatsze w N i P. Innymi z kolei zjawiskami jest zwiększanie mobilności zaadsorbowanych i niedostępnych węglowodorów, np. w porach skał itp. gdzie surfaktanty pozwalają na wydobywanie takich węglowodorów przez co możliwe jest ich późniejsze wykorzystanie przez mikroorganizmy. Aby nie rozwijać tego wątku w nieskończoność, zastosowany przez wielu autorów w tematyce biodegradacyjnej/bioremediacyjnej skrót myślowy dotyczący roli surfaktantów, stał się samodzielnym bytem, który powoduje szereg problemów w interpretacji wyników.
- strona 8 - Rysunek 8. Mechanizmy degradacji substratów hydrofobowych w obecności biosurfaktantów w komorze anodowej MFC. Jeżeli ten rysunek ma faktycznie pokazywać mechanizmy degradacji to musimy przeanalizować po kolei każdy z tych mechanizmów. Solubilizacja oparta na tworzeniu micel wymaga wytworzenia biosurfaktantu w ilości większej niż CMC. Ponieważ w publikacji 2 i 3 pojawiają się informacje dotyczące ramnolipidów, to oznacza, że spadek napięcia powierzchniowego musi osiągnąć wartość 26-32 mN/m aby potwierdzić tworzenie micel i występowanie wspomnianego mechanizmu. Ponadto hydrofobowe węglowodory zostaną zamknięte w hydrofobowym wnętrzu micel, a zewnątrz strona micel jest hydrofilowa. Micelle ramnolipidów są dużo większe niż komórki bakteryjne. Pojawia się pierwsze pytanie jak komórka ma odzyskać węglowodory z wnętrza micel i nie metabolizować biosurfaktantów tak, aby mogły być ponownie wykorzystane? Ponadto typowe bakterie Gram-ujemne posiadają doskonały mechanizm modyfikacji hydrofobowości ściany komórkowej, co w praktyce oznacza, że mogą modyfikować LPS oraz dzięki patchworkowej strukturze domen hydrofobowych i hydrofilowych błyskawicznie adoptować się do hydrofobowych źródeł węgla. Typowe bakterie tego typu umiejscawiają się na granicy faz, gdyż z jednej strony pozyskują źródło węgla, a z drugiej mają stały dostęp do soli mineralnych i wody. Co więcej wytwarzanie dużych ilości biosurfaktantów jest energetycznie nieopłacalne, gdyż w środowisku tylko część

wydzielonych biosurfaktantów wróci do komórki jako micela, a większość zaadsorbuje się na wprowadzonym w nadmiarze hydrofobowym substracie, zaadsorbuje się w biofilmie itp. Węglowodory i tak będą wnikać do komórki na zasadzie transportu pasywnego przez membranę. Jeżeli jeszcze przyjmujemy, że biosurfaktanty są biodegradowalne to inne gatunki mogą zareagować w dwojaki sposób. Część z nich wykorzysta biosurfaktanty produkowane przez *Pseudomonas aeruginosa* jako źródło węgla, ale istnieją również większe szanse, że ramnolipidy wykażą działanie toksyczne i zahamują ich wzrost, przyczynią się do rozpadu biofilmu itp. Zazwyczaj także kluczowe elementy komórkowe utleniające węglowodory znajdują się blisko wewnętrznej membrany. Dokładne mechanizmy działania mikroorganizmów degradujących węglowodory w kontekście poboru hydrofobowych źródeł węgla opisano w kluczowych książkach takich jak:

- Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, Editor-in-Chief Kenneth N. Timmis
- Petroleum Microbiology. Jean-Paul Vandecasteele

Stąd też ten poglądowy rysunek nie powinien być wykorzystywany do interpretowania rzeczywistych mechanizmów gdyż uzyskane przez Doktoranta wyniki są o wiele ciekawsze niż próby ich powiązania z takimi schematami.

- strona 26 - „Trudnodegradowalne substraty będące złożoną mieszaniną węglowodorów zwykle wymagają rozbudowanego konsorcjum, aby uzyskać wysoki stopień degradacji oraz zadowalającą wydajność biosyntezy” – idealnym rozwiązaniem są kultury mieszane, które sprawdzają się dość dobrze lub społeczności (microbial community) jak osad czynny. W wielu publikacjach poświęconych MFC pojawia się konsorcjum, ale nie są to konsorcja, co pokazują nawet sami autorzy takich prac, analizując procesy adaptacyjne. Brak udowodnionych zależności pomiędzy szczepami nie pozwala na stosowanie tej nazwy.
- strona 28 – Tabela 1. Produkcja biosurfaktantów w MFC. „niezidentyfikowany biosurfaktant” – Doktorant wskazuje bardzo ważną kwestię. Biosurfaktant musi posiadać zidentyfikowaną strukturę. Mieszaniny związków organicznych również wykazują działanie analogiczne do biosurfaktantów, posiadają zdolność do obniżenia napięcia powierzchniowego itp. – na tej zasadzie działają sole kwasów karboksylowych. Dlatego też bardzo ostrożnie należy podchodzić do kwestii wytwarzania biosurfaktantów jeśli substratem są oleje roślinne. Warto podkreślić, że w pracy 3, Doktorant ponad wszelką wątpliwość udowodnił wytwarzanie ramnolipidów, co eliminuje wątpliwości, że mierzony spadek napięcia powierzchniowego pochodzi od kwasów karboksylowych, ich soli oraz metabolitów bakteryjnych wydzielanych do medium/MFC.
- Publikacja 1 – bardzo ciekawe badania, zwłaszcza ze względu na długi okres trwania eksperymentu. Krótkotrwałe badania bardzo często nie mają szansy wykazać potencjalnych problemów, które pojawiają się gdy układ dochodzi do stanu równowagi. Jak słusznie wskazał Doktorant, kluczową kwestią jest powstanie stabilnego biofilmu, który też ulega starzeniu. Przede wszystkim tak złożone społeczności jak osad czynny dostosowują się do wykorzystywanego źródła węgla. W oczyszczalni mikroorganizmy mają do dyspozycji mieszaninę ogromnej ilości różnych związków, a w eksperymentach laboratoryjnych muszą przystosować się do wybranego źródła węgla. To znacząco zmienia strukturę gatunkową osadu czynnego. W tym miejscu nasuwa się pewne pytanie. Ponieważ biofilm dostosowuje się do źródła węgla, warto sprawdzić jak zachowuje się MFC gdy po pewnym czasie dokonamy zmiany. Czy znane są Doktorantowi prace, w których zmieniano źródło węgla np. z hydrofilowego na hydrofobowe i ponownie na hydrofilowe? Zdecydowanie bardziej w długoterminowej skali, np., nie wcześniej niż po 3 miesiącach, aby mieć pewność, że obserwowane działanie nie jest związane z wykorzystywaniem resztek źródła węgla. Bardzo ciekawym wydaje się być równoległe porównanie układów, w których stosuje się tylko hydrofilowe lub tylko hydrofobowe źródło węgla z układami, gdzie naprzemiennie stosuje się źródło hydrofilowe i hydrofobowe ew. również w wariacie rozpoczynającym się od hydrofobowego źródła by później wprowadzić hydrofilowe itp.. Taki eksperyment mógłby być wzbogacony o analizy zmian w strukturze społeczności – np. NGS. Poproszę o odniesienie się do tej sugestii wraz z uzasadnieniem czy i ewentualnie dlaczego takie badania byłyby interesujące.
- Publikacja 2 – Doceniam interpretację różnic w funkcjonowaniu układu horyzontalnego i

wertykalnego. Można by również rozważyć alternatywną wersję. W układzie horyzontalnym w teorii powinien być lepszy kontakt hydrofobowego i unoszącego się na powierzchni źródła węgla z mikroorganizmami i elektrodą, wymagający jednak wytworzenia biofilmu. Natomiast układ wertykalny przypomina typowy bioreaktor z mieszaniem. Tego rodzaju rozwiązanie zapewnia bardzo skuteczne wykorzystanie hydrofobowych olejów roślinnych np. przy produkcji kwasu cytrynowego przez niekonwencjonalne drożdże np. *Yarrowia lipolytica* (alternatywna dla typowej produkcji z cukrów z wykorzystaniem *Aspergillus niger*). Jednak w tym przypadku kontakt pomiędzy planktonową, przyczepioną do hydrofobowych kropelek oleju biomasą a elektrodą będzie znacząco ograniczony. W konsekwencji można oczekiwać mniejszej efektywności działania wertykalnego układu MFC. Doskonałą weryfikacją tego mechanizmu byłoby wyznaczenie kinetyki degradacji oleju w połączeniu z monitorowaniem przyrostu biomasy. Stąd też warto byłoby przeprowadzić dodatkowe eksperymenty aby móc w pełni odpowiedzieć na powyższe pytanie. Proszę o odniesienie się do tych rozważań.

- Publikacja 2 - W obecnym wariantcie eksperymentu wiemy, że: „The medium with waste vegetable oil was replaced every 1-2 days (HRT=32.6±16.4 h).” co nie jest do końca jasne gdyż olej roślinny stanowi doskonale źródło węgla, które wymaga jedynie hydrolizy, a uwolnione kwasy karboksylowe mogą być bezpośrednio wykorzystane do tworzenia fosfolipidów lub podlegać procesom β -oksydacji. Oleje roślinne są często wykorzystywane w biotechnologii gdyż jest to substrat bardzo energetyczny ponieważ są tylko 10% mniej kaloryczne niż olej napędowy. Przystawiając tłuszcze do cukrów liczba kalorii na gram jest dwukrotnie większa. Stąd też nie dziwi fakt, że zarówno mikroorganizmy (single cell oil), roślinny jak i zwierzęta preferują gromadzenie zapasów w postaci odpowiednich tłuszczów. Dlatego nie do końca zgadzam się z takimi generalnymi określeniami: „However, the complex composition and hydrophobic nature of the waste vegetable oils is more challenging in terms of microbial adaptation in microaerobic environment”. Jest to dobre stwierdzenie w odniesieniu do związków, które powstały w wyniku smażenia itp. jednak niezbyt fortunne jeśli chodzi o typowe składniki olejów roślinnych i ich hydrofobową naturę.
- Publikacja 2, Figure 5 – Doktorant sugeruje powstawanie ramnolipidów w opisywanych systemach badawczych. Nie jest to wykluczone, jednak wydajność tej biosyntezy biosurfaktanta jest niewielka. Zgodnie z moimi uwagami (strona 19, Rysunek 5) w żadnym z układów nie odnotowano spadku napięcia powierzchniowego do typowej dla ramnolipidów wartości CMC w zakresie 26-32 mN/m, co oznacza, że synteza bez wątpienia nie przekracza progu kilkudziesięciu mg/L, nawet zakładając adsorpcję w MFC. Warto rozważyć alternatywną wersję interpretacji wspomnianego wyżej rysunku. W każdym z horyzontalnych MFC zaobserwowano spadek napięcia powierzchniowego w początkowych godzinach, po czym napięcie wzrastało do poziomu typowego dla hydrofobowych pożywek. Zdaje się to potwierdzać, że mikroorganizmy potrzebowały biosurfaktanta (ramnolipidów) bardziej jako cząsteczek sygnałowych, pozwalających im wytworzyć odpowiednią strukturę podczas wstępnych etapów formowania biofilmu, ewentualnie w niewielkim stopniu modyfikujących kontakt pomiędzy elektrodą, substratem a komórkami. Potem jednak nie produkują tego typu związków nawet jeśli gęstość mocy maleje. Natomiast w układzie wertykalnym spadek napięcia powierzchniowego jest znikomy, gdyż jak już poprzednio wspomniałem mieszanie zapewnia doskonałe warunki do kolonizacji kropelek oleju i ich degradację przez zaadsorbowane na powierzchni kropelek mikroorganizmy, przy zachowaniu maksymalnego transferu innych składników z medium hodowlanego do wnętrza komórek. Szybka degradacja substratu będzie odbywać się do momentu limitacji np. przez zbyt małą ilość N, P, innych mikroelementów lub na skutek nadmiernego wzrostu biomasy i ograniczenia transferu tlenu, co wydaje się być zazwyczaj mniejszym problemem w układach z mieszaniem. Proszę o odniesienie się do tej interpretacji wraz ze wskazaniem argumentów za i przeciw.
- Publikacja 2 – Doktorant w pozostałościach po degradacji oleju odnotowuje obecność długołańcuchowych alkanów. Oczywiście można zgodzić się z interpretacją, że mikroorganizmy dokonują redukcji wolnych kwasów do aldehydów a następnie alkanów, ale od razu pojawia się pytanie o sens tego typu transformacji z punktu widzenia zarządzania energią w komórkach. Kluczowym i najbardziej wymagającym etapem wykorzystywania alkanów jest ich utlenienie do odpowiedniego alkoholu. Następne etapy utleniania do aldehydu i kwasu karboksylowego są już

zdecydowanie łatwiejsze. Uzyskany kwas jest, jak już wspomniałem powyżej we wcześniejszych komentarzach, wykorzystywany do produkcji fosfolipidów, materiałów zapasowych, pozyskiwania energii itp. Generalnie tego typu strategia jest najczęściej spotykana u bakterii i drożdży, natomiast wytwarzanie alkanów jest typowym zachowaniem alg. Stąd też poszukiwałbym innego wytłumaczenia powstawania alkanów a takim wydaje się być elektroliza Kolbego, w której z soli kwasów karboksylowych generowane są alkany. Bardzo proszę o hipotetyczne omówienie takiej możliwości wraz ze wszystkimi argumentami za i przeciw.

- Publikacja 3 – Doskonałym potwierdzeniem produkcji ramnolipidów są wyniki chromatograficzne, które bezspornie świadczą o wytwarzaniu tego biosurfaktanta w analizowanych układach MFC. Opisywane przez Doktoranta struktury chemiczne to typowe przykłady ramnolipidów, które składają się z szeregów homologicznych β -hydroksykwasów o różnej długości łańcucha i wielokrotności pierścieni ramnozy przyłączonej do cząsteczki kwasu (lub kwasów). Nadal jednak wydajność tej biosyntezy jest niewielka co widać na rysunku 4: „Changes in Surface tension during the degradation of the waste cooking oil” gdzie najniższa wartość napięcia powierzchniowego oscyluje w zakresie 54-55 mN/m, czyli nadal znacznie powyżej CMC. Jak już wspominałem dla mieszanin mono i diramnolipidów CMC wynosi 26-32 mN/m co odpowiada 50-80 mg/L ramnolipidów w roztworze. Dokładne parametry zależą od stopnia oczyszczenia ramnolipidów oraz ich rozdziału na poszczególne struktury. Jeżeli chcemy konkurować z najbardziej wydajnymi procesami wytwarzania ramnolipidów to musimy produkować je z wydajnością w zakresie 30-40 g/L. Oznacza to 300-400-krotne przekroczenie CMC. To porównanie pokazuje, że zaprezentowane przez Doktoranta badania są raczej próbą poszukiwań roli ramnolipidów w procesach zachodzących w MFC podczas degradacji oleju roślinnego, niż poszukiwaniem wydajnych metod syntezy tego biosurfaktanta. Nadal jednak eksploracja tego obszaru jest kluczowa dla zrozumienia po co są produkowane biosurfaktanty i jaką rolę pełnią w złożonych społecznościach mikrobiologicznych. Z tego powodu bardzo podobają mi się badania Doktoranta, niezależnie od sposobu interpretacji wyników.
- Kontynuując rozważania w tej sekcji, zastanawia mnie także kwestia analizy bioróżnorodności, która jest obecnie mocno eksploatowana przez niemal wszystkie ośrodki naukowe. Każdy mikrobiom po etapie adaptacyjnym, osiąga stan równowagi związanej z warunkami panującymi „tu i teraz” a jakiegokolwiek wprowadzenie innego źródła węgla czy zmiana czynników zewnętrznych, powoduje zmiany w bioróżnorodności. Stąd też warto zastanowić się jaką wartość przedstawiają zestawienia ilościowego występowania poszczególnych rodzin czy gatunków dla finalnych zastosowań. Czy ma to tylko znaczenie pomocnicze i raczej opisowe czy może jednak wynikają z tego konsekwencje istotne dla procesów zachodzących w MFC? O wiele ciekawszym wydaje się sprawdzenie ekspresji genów kluczowych za syntezę ramnolipidów np. *RhIA* czy *RhIC*, dzięki czemu Doktorant miałby możliwość monitorowania kiedy ten biosurfaktant jest wytwarzany. Konieczne byłoby także wprowadzenie ilościowej analizy ramnolipidów aby powiązać ekspresję z wydajnością produkcji. Bardzo proszę o podjęcie dyskusji prowadzącej do wskazania jakim zestawem metod chciałby dysponować Doktorant aby prowadzić wymarzone badania.
- Typowym sposobem stymulowania produkcji ramnolipidów jest limitacja źródłem azotu. Według zweryfikowanych hipotez, ramnolipidy mają umożliwiać bakteriom wchodzącym w skład biofilmu, zmianę formy ze związanej w biofilmie, w formę planktonową, która poszukuje nowej niszy środowiskowej bez czynników limitujących wzrost. Wspominałem o tym mechanizmie wcześniej. Warto sprawdzić taki mechanizm stymulowania produkcji ramnolipidów poprzez wprowadzenie znacznie mniejszych ilości azotu do pożywki.
- Publikacja 4 – „After treatment, the membranes were rinsed with Milli-Q water and subsequently soaked in a solution containing 0.5 g of rhamnolipids (AGAE Technologies) in 100 ml of Milli-Q water for 1 h.” – brakuje zdefiniowania jaki preparat wykorzystano w tych badaniach. Typowym produktem AGAE, Oregon USA są R90 i R95 co oznacza, że nie są to czyste ramnolipidy. Bez sprecyzowania rodzaju wykorzystanego produktu nie można wykluczyć oddziaływań pozostałości medium hodowlanego i produktów rozpadu komórek, które są integralnym składnikiem słabiej oczyszczonych ramnolipidów.
- Nie do końca rozumiem na czym ma polegać modyfikacja opisywanych membran za pomocą

ramnolipidów. Czy mają to być oddziaływania chemiczne na podstawie wytworzenia nowych wiązań czy adsorpcja fizyczna? Ramnolipidy są przykładem anionowego związku powierzchniowo-czynnego dlatego ich oddziaływania z sorbentami są dość słabe, w przeciwieństwie do bardzo mocnych oddziaływań kationowych związków powierzchniowo-czynnych. Wydaje się, że modyfikacja polegająca na zanurzeniu membrany w roztworze surfaktanta, a następnie przemycie wodą to za mało aby faktycznie modyfikować membranę. Zaadsorbowane surfaktanty będą po prostu wymywane w miarę wprowadzania kolejnych porcji np. wody. Brakuje typowych badań adsorpcji i desorpcji wraz z wyznaczeniem odpowiednich parametrów pozwalających na opis rodzaju mechanizmu oddziaływań pomiędzy analizowanym związkiem a sorbentem. Test wymywania polegający na analizie napięcia powierzchniowego zdecydowanie nie jest optymalny do tego celu. Lepszym rozwiązaniem byłoby zastosowanie technik chromatograficznych i wykonanie bilansu, gdyż odpowiedni wzorec ramnolipidów znajduje się już do dyspozycji Doktoranta.

- Szczególnie chciałbym podkreślić fakt, że Doktorant w tej publikacji bardzo wyraźnie rozwija swoje postrzeganie biosurfaktantów. Coraz wyraźniej widać trafniejsze interpretacje obserwowanych zjawisk jak przykładowo: „Even small amounts of released biosurfactants may improve the initial stage of biofilm development (Fig 4). This observation is consistent with the electrochemical impedance spectroscopy results ...” co doskonale świadczy o stopniowym zgłębianiu roli biosurfaktantów. Może brakuje bardziej śmiałych i nieszablonych wniosków oraz krytycznej interpretacji wyników, ale przy ogromnej ilości biosurfaktantowej propagandy, ostrożność Doktoranta jest zrozumiała. Wydaje się również, że zdecydowanie lepszym tytułem rozprawy byłoby nakierowanie na poszukiwanie roli biosurfaktantów przy wykorzystaniu hydrofobowych substratów w MFC niż ich pozyskiwanie.

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską należy wyróżnić bardzo duży wkład własnej pracy Doktoranta. Należy podkreślić, że wykonane eksperymenty wnoszą wiele ciekawych wyników i zdecydowanie mogą przysłużyć się poznaniu roli biosurfaktantów w procesach realizowanych w MFC. Jest to również bardzo dobra praca doktorska zrealizowana w formie zbioru publikacji.

Wniosek końcowy

Analizując niniejszą pracę doktorską pod kątem aktualności i oryginalności podjętych badań można stwierdzić, że Autor odnalazł swoją niszę badawczą, a zrealizowane przez Niego badania będą interesujące dla szeregu naukowców zainteresowanych poznaniem mechanizmów wytwarzania biosurfaktantów w MFC.

Reasumując, przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską mgr inż. Aleksandra de Rosset pt. **„Pozyskiwanie i wykorzystanie biosurfaktantów z olejów odpadowych pochodzących z przemysłu spożywczego w mikrobiologicznych ogniach paliwowych”** oceniam pozytywnie oraz stwierdzam, że spełnia ona wszelkie warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r., poz. 742 z późn. zm.). Ponadto, praca stanowi oryginalne rozwiązanie zagadnienia naukowego oraz wykazuje niezbędną ogólną wiedzę teoretyczną Autora i umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych dlatego wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Aleksandra de Rosset do dalszych etapów postępowania doktorskiego w dziedzinie nauk inżynierjno-technicznych, w dyscyplinie inżynieria chemiczna.

Z poważaniem,



prof. dr hab. inż. Łukasz Chrzanowski