



Prof. dr hab. Hanna Mazur-Marzec

 **UNIwersYTET GDAŃSKI**  
**Instytut Oceanografii**  
Zakład Biotechnologii Morskiej  
al. Marsz. J. Piłsudskiego 46, 81-378 Gdynia  
T 58 523 66 21; 58 523 67 12

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Wojciecha Ratajczyka zatytułowanej „Zagrożenia środowiskowe wynikające z odprowadzania ścieków oczyszczonych do wód morskich”, wykonanej w Zakładzie Toksykologii Środowiska na Wydziale Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. Lidia Wolska. Recenzja została wykonana na zlecenie prof. dr hab. Andrzeja Basińskiego, Dziekana Wydziału Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

W przedstawionej do oceny pracy doktorskiej podjęto próbę określenia potencjalnych zagrożeń związanych z odprowadzeniem do Zatoki Gdańskiej ścieków oczyszczonych z czterech oczyszczalni zlokalizowanych w tym rejonie.

W chwili obecnej, w ocenie jakości ścieków uwzględniane są ich parametry fizykochemiczne, a sam proces ich oczyszczania prowadzony jest głównie pod kątem redukcji substancji biogennych. Stosowane technologie prowadzą do drastycznego ograniczania ilości substancji szkodliwych, w stosunku do ich zawartości w ściekach surowych. Dodatkowo, długie kolektory odprowadzające ścieki daleko w głąb akwenu ułatwiają ich rozcieńczenie. Jednak mimo niewielkich stężeń w ściekach oczyszczonych odprowadzanych do morza, związki trwała i hydrofobowe wykazują tendencję do kumulowania się w osadach oraz organizmach. Ponadto, nawet przy śladowych ilościach pojedynczych związków dochodzi do ich addytywnego działania, co może skutkować negatywną reakcją niektórych grup organizmów i zaburzeniem funkcjonowania całego ekosystemu.

Przewidywanie skutków odprowadzania do środowiska ścieków oczyszczonych (oczyszczonych zgodnie z obowiązującymi normami) nie jest rzeczą prostą. Brak jest wciąż narzędzi, które pozwoliłyby przewidzieć konsekwencje obecności związków szkodliwych (nawet w niskich stężeniach) dla wszystkich, czy chociażby kluczowych, organizmów

występujących w danym ekosystemie. Na chwilę obecną, nasza ocena ryzyka środowiskowego może opierać się jedynie na pomiarze stężenia zanieczyszczeń oraz na wynikach testów prowadzonych na wybranych organizmach, reprezentujących różne formy życia.

Taką też strategię oceny zagrożenia przyjął Doktorant w swej pracy. Ocenę tę przeprowadził na podstawie analiz chemicznych i testów biologicznych bogatego materiału jakim były ścieki surowe i oczyszczone z czterech oczyszczalni zlokalizowanych w obszarze Zatoki Gdańskiej (materiał z różnych pór roku), oraz na podstawie analizy licznych próbek osadu i wody pobranych w pobliżu (wokół) kolektorów zrzutowych tych oczyszczalni. Analizy chemiczne z zastosowaniem GC-MS obejmowały oznaczenia zawartości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oraz polichlorowanych bifenyli (PCB). Wykryto również imponującą liczbę (ok. 800) innych związków organicznych – naturalnego i antropogenicznego pochodzenia. Oznaczono szereg metali ciężkich, w tym gadolin, stosowany w diagnostyce medycznej. Dla urealnienia oceny zagrożenia mgr Wojciech Ratajczyk wykorzystał szeroką gamę testów biologicznych z zastosowaniem bakterii (*Vibrio fischeri*), skorupiaków (*Daphnia magna*, *Thamnocephalus platyurus*, *Brachionus calyciflorus*), roślin jednoliściennych (*Sorghum saccharatum*) i dwuliściennych (*Sinapis alba*). Aktywność hormonalna próbek została oceniona z wykorzystaniem drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (test XenoScreen YES/YAS). Oznaczano również ilość bakterii i grzybów należących do kilku grup. Przeprowadzono badania lekooporności wyizolowanych bakterii *E. coli*. Można więc powiedzieć, że badania prowadzono w sposób niezwykle kompleksowy, wykorzystując wszelkie możliwości własnego laboratorium (Zakładu Toksykologii Środowiska GUMed). W pewnym zakresie korzystano również z innych jednostek zajmujących się analizą próbek środowiskowych. Dotyczyło to oznaczeń metali ciężkich (wykonanych w Instytucie Morskim w Gdańsku) oraz badań mikrobiologicznych (wykonanych w Zakładzie Immunologii i Mikrobiologii Środowiska, GUMed). Charakterystykę takich parametrów ścieków jak ChZT, BZts, N<sub>og</sub>, P<sub>og</sub>, zawiesina ogólna przeprowadzono w laboratoriach oczyszczalni. Tylko przyjęcie takiej strategii, uwzględniającej szeroką charakterystykę ścieków i miejsca ich zrzutu do Zatoki mogło pozwolić na rzetelną ocenę ich wpływu na środowisko. Konsekwencją jest wielowątkowość pracy i jej interdyscyplinarny charakter.

### **Uwagi szczegółowe**

Zasadniczo struktura rozprawy doktorskiej jest typowa dla tego rodzaju dzieł i zawiera wszystkie jej podstawowe składowe. Choć zaskoczeniem dla mnie jest zamieszczenie streszczeń na końcu dzieła, po spisie literatury i załącznikach, zamiast na jego początku. Nie widzę też specjalnego powodu rozbicia części wstępnej na krótki rozdział WSTĘP oraz zasadniczą CZĘŚĆ TEORETYCZNĄ. Taka organizacja treści rozprawy może jednak wynikać ze zwyczajów ogólnie akceptowanych w niektórych jednostkach.

CZĘŚĆ TEORETYCZNA zawiera interesujący rys historyczny rozwoju metod doprowadzania wody i zarządzania ściekami. Śledzimy w nim też rozwój świadomości człowieka w zakresie higieny sanitarnej na tle zmian cywilizacyjnych. W rozdziale tym

przedstawiono najważniejsze uregulowania prawne obowiązujące na poziomie kraju i Unii Europejskiej dot. polityki wodnej i zarządzania ściekami. Tę część pracy kończy informacja o podstawowych chemicznych i biologicznych składnikach ścieków, które mogą zagrażać środowisku i zdrowiu człowieka. Szkoda, że część danych, na które powołuje się Doktorant na temat skażenia środowiska metalami ciężkimi, WWA czy PCB nie jest uaktualniona. Powoływanie się na publikacje z 2000 r. i starsze może wprowadzać fałszywy obraz obecnej sytuacji.

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA napisana jest w sposób niejednolity. Część 2.1.1. zawiera niezwykle szczegółową listę odczynników, urządzeń i pozostałego sprzętu wykorzystanego w analizach i testach. W moim przekonaniu, w tym zakresie istotne są informacje tylko o tych elementach, które mogą mieć wpływ na jakość wyników, np. producent substancji wzorcowych czy model spektrometru. Nie ma potrzeby wymieniać składowych komercyjnie dostępnych testów toksykologicznych lub takich elementów jak kolbki szklane, fiołki, szalki czy taśma do metkownicy. Niektóre z tych rzeczy wymieniane są nawet dwukrotnie. Z drugiej strony procedury analityczne takie jak ekstrakcja i oznaczanie WWA czy PCB przedstawione są jedynie w formie schematu, bez podania szczegółów takich jak np. czas trwania ekstrakcji, objętości rozpuszczalników użytych w procesie ekstrakcji, objętości złoza kolumnienek SPE, warunki temperaturowe procesu, dokładne warunki analizy MS. W opisie metod mikrobiologicznych brak danych, jak zachowano warunki beztlenowe doświadczenia (2.2.8.3) oraz jak, skąd i kto wyizolował bakterie *E. coli* stosowane w badaniach lekooporności (2.2.8.4).

Co do pobierania osadu za pomocą czerpacza van Veen'a, nie zapewnia ona dobrej jakości materiału do badań prowadzonych w tej pracy. Aby być pewnym, że analizowana jest zawsze ta sama warstwa osadu i nie uległ on przemieszaniu, próbki powinny być pobierane sondą rdzeniową.

W rozdziale WYNIKI przedstawiono opracowane dane uzyskane w trakcie analiz chemicznych i testów przeprowadzonych dla próbek ścieków surowych i oczyszczonych (czasem również ich rozcieńczeń) pobranych z czterech oczyszczalni w różnych latach i porach roku oraz dla próbek z trzech różnych warstw w kolumnie wody i dla osadów zebranych z kilku stacji pomiarowych w pobliżu ujść czterech kolektorów. Ze względu na dużą liczbę analizowanych próbek oraz wiele stosowanych metod pomiarowych i testów, trudno zorientować się, które wyniki dotyczą tego samego materiału (i czy dotyczą tego samego materiału). Wymieniana jest jedynie liczba analizowanych próbek. Z pewnością czytelna prezentacja wszystkich uzyskanych wyników sama w sobie stanowiła duże wyzwanie dla Doktoranta.

W tym rozdziale szczególnie razi sposób przedstawiania danych na Rys. 44, 46, 47 48, 49 itd. Stosowanie wykresu liniowego dla prezentacji wartości stężeń różnych zanieczyszczeń dla danej oczyszczalni nie jest niczym uzasadnione i stanowi ewidentny błąd. W przypadku rysunków 108-112, symbole oczyszczalni powinny zostać wyjaśnione w podpisie.

Natomiast przypisywanie niewielkiego wzrostu korzeni *Sinapis alba* zjawisku hormezy uważam za nadinterpretację. Nie wykazano, aby w tym przypadku ten sam czynnik był

szkodliwy w wyższych stężeniach i powodował stymulację wzrostu w niższych stężeniach. Ponieważ wynik testu na żywym organizmie ma nieco inną wagę niż pomiar stężenia wykonany metodą chemiczną, przy każdym teście powinno być podane, jaka różnica względem kontroli może być uznana za efekt istotny.

Podrozdział 2.4.3.5. zawiera Tabelę 48 przedstawiającą listę związków zidentyfikowanych w osadach. Brak natomiast danych dokumentujących prawidłowość procesu identyfikacji chociażby dla jednego związku z każdej klasy. Nie jest też jasne, co oznaczają znaki X i XX oraz kod kolorów użyty w tabeli.

W niektórych przypadkach (np. str. 154-156) Doktorant ogranicza się do zestawienia wyników w formie wykresu i/lub tabel, z pominięciem opisu słownego. Zarówno w części WYNIKI jak i DYSKUSJA opis słowny Doktorant zastępuje poprzez przedstawienie treści w punktach. Możliwe, że taka forma pozwala lepiej „ogarnąć” całość zebranych danych, ale raczej nie jest powszechnie spotykana.

Cały rozdział WYNIKI posiada nagłówek CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA. Ponadto, część tekstu posiada cechy komentarza do wyników i powinna zostać przeniesiona do rozdziału DYSKUSJA (np. ze str. 113, 115).

DYSKUSJA jest proporcjonalnie obszerna do liczby i wagi zebranych wyników. Jednak Doktorant nie wychodzi w niej poza obszar objęty badaniami. Nie ma więc możliwości porównania sytuacji występującej w rejonie omawianych oczyszczalni z innym środowiskiem. Czy podobne obserwacje już wcześniej zostały opisane przez innych autorów? Odniesienie do istniejącej wiedzy związanej z tematyką pracy najczęściej ogranicza się w rozprawie do podaniu źródła literaturowego (zamiast dyskusji).

Nietypowo, w rozdziale tym znajdują się dane, które powinny zostać zamieszczone w rozdziale WYNIKI, np. Rys. 114, 117-119 czy Tab. 79. Rysunki 117-119 przedstawiają co prawda widma mas trzech wybranych związków zidentyfikowanych w próbkach ścieków oczyszczonych, jednak mała czytelność oraz brak wyjaśnień nie pozwalają na ich wykorzystanie do weryfikacji uzyskanych wyników.

W pracy kilkakrotnie używane jest określenie „woda morska” (np. str. 177) w odniesieniu do Zatoki Puckiej czy Zatoki Gdańskiej. Tymczasem, Bałtyk jest zbiornikiem baczynym, o zasoleniu znacznie niższym niż zasolenie wody morskiej. W rejonie badań prowadzonych w recenzowanej pracy zasolenie to jest nawet niższe niż średnia wartość dla Morza Bałtyckiego.

W podsumowaniu zawarto wniosek o wzroście lekooporności mikroorganizmów. Według mnie nie jest on uzasadniony przedstawionymi wynikami. Choć w pracy wykazano lekooporność wyizolowanych szczepów *E. coli*, to nie odniesiono jej do żadnej próbki kontrolnej.

Liczne zestawienia tabelaryczne zamieszczone w tym rozdziale ułatwiają ocenę efektywności procesu oczyszczania ścieków oraz ich wpływu na środowisko Zatoki Gdańskiej i Puckiej. Pozwalają też lepiej ocenić wartość wyników uzyskanych przez Doktoranta.

## Uwag dodatkowych:

Wartość pracy doktorskiej w znacznym stopniu umniejsza jej strona edytorska. Zarówno styl wypowiedzi jak i forma (i format) tabel i rysunków powinny zostać gruntownie poprawione i ujednolicone przed upublicznieniem. W pracy jest wiele fragmentów (akapitów), które powinny zostać przeredagowane. Fragmenty te zaznaczyłam w kopii pracy, którą otrzymałam do recenzji. Poniżej, zamieszczam listę (niekompletną) szczegółowych uwag dot. treści oraz zwrotów użytych w pracy.

Str. 11: Wykaz skrótów i akronimów: nieprawidłowe wyjaśnienie w języku polskim zwrotu „effective concentration”; chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią mas (a nie spektrometrem mas); niekonsekwentnie używane są małe i duże liter;

Str. 13: To nie substancje są regulowane prawnie tylko ich poziom itp., wzmocnienie efektu toksycznego, a nie wzmocnienie potencjalnego efektu toksycznego;

Str. 15: Styl: „Każda z jednostek periodyzacji charakteryzuje się innymi osiągnięciami z zakresu osiągnięć technologicznych...”?

Str. 19: Zwroty: „rozprzestrzenianie się bakterii” (czy rozprzestrzenianie epidemii?); „zachorowania bakteryjne” (infekcje?); „oraz odkryciu przyczyny” (oraz odkrycie przyczyny);

Str. 21: Zdanie: „pod koniec XIX w. (?) odkrycia starożytnych cywilizacji zostały niejako utracone wraz z upadkiem cesarstwa zachodniorzymskiego”?

Str. 25: Tabela 1: Uwagi zamieszczone w kolumnie „Zasada działania” mają formę notatek w brudnopisie. Rubryka „proces chemiczny”: „związków rozpuszczalnych” czy raczej rozpuszczonych; „dawane są” czy dodawane są?

Str. 27: „Pierwsze procesy usystematyzowania” czy „próby”?

Str. 32: Tabela 2, Nagłówek pierwszej kolumny: zamiast „Nazwa substancji” powinno być „Klasa/grupa związków”;

Str. 33: Powinno być „z powodzeniem” (zamiast z powodzeniem); Styl: „obecnie wykorzystywane są ... testy, wykorzystujące nie tylko organizmy...”;

Str. 35: Tabela 3 powinna być zamieszczona w całości na jednej stronie. W nagłówku trzeciej kolumny powinno być „oznaczone stężenia” a nie „zidentyfikowane”;

Str. 37: Trudno się zgodzić z kategoriycznym stwierdzeniem, że „...najistotniejsza jest forma występowania metali ciężkich, a nie całkowita ich zawartość”;

Str. 37: WWA nie znajdują się na liście trwałych zanieczyszczeń organicznych (TZO);

Str. 40: „W ściekach surowych i osadzie mogą występować: bakterie, grzyby....” Oczywiście, że występują. „Bakterie flory heterotroficznej” → bakterie heterotroficzne;

Str. 40: Wymieniając zagrożenia biologiczne, wymieszano bakterie, pierwotniaki i grzyby w tak sformułowanym zdaniu, jakby wszystkie te organizmy należały do bakterii;

Str. 42: Co Doktorant miał na myśli pisząc: „Wszystkie opisane zagrożenia wpływają również w sposób pośredni i bezpośredni na zmiany w ukształtowaniu dna”?

Str. 43: Zdania: „poszczególne jednostki taksonomiczne (?) mają zdecydowanie inną odporność na poszczególne związki” oraz „W zbiornikach wodnych zostaje również upośledzony rozwój zooplanktonu, zaburzenie stosunków gazowych wód, a także silna alkalizacja”?

Str. 51: Zdanie: „...„konieczne było podzielenie ekstraktu na dwie części: pierwszą – wykorzystano do oznaczeń związków z grupy WWA i PCB, drugą – do identyfikacji związków organicznych”...  
związków organicznych”...

WWA i PCB to też związki organiczne;

Str. 55: Tabela 6, nagłówek drugiej kolumny „Masy monitorowanych jonów” czy wartości  $m/z$  monitorowanych jonów?

Str. 56: Tabela 7, nagłówek drugiej kolumny „jony masowe”??

Str. 56: Porównano wielkości sygnału czy powierzchni pików?; „na podstawie wielkości sygnału odpowiadającemu” (odpowiadającego)

Str. 57: W tytule podrozdziału 2.2.4 znajduje się: „Identyfikacja związków organicznych...”. Tymczasem w tekście opisano procedurę ekstrakcji, analizę jakościową oraz charakterystykę struktury na podstawie analizy GC-MS;

Str. 59: 2.2.4.2 Tytuł podrozdziału: „Analiza jakościowa organicznych”... Brakuje wyrazu związków;

Str. 64 i inne: Odczyt wyników testu (nie wyników toksyczności)

Str.65: Zwrot „Przeniesienie ... *Brachionus* ... przy użyciu mikroskopu”? Czy przy użyciu pipety?; „w celu sprawdzenia czułości skorupiaków” czy „wrażliwości” ?

Str. 71 i inne: kwas aspartowy??; Co to za kwas? Zwrot „oceniono hodowlę drożdży” (co oceniono?); Zwrot: „*Saccharomyces*... zostały narażone na seryjne rozcieńczenia badanych próbek”?

Str. 72: Zwrot: „gęstość optyczna komórek” → gęstość optyczna zawiesiny komórek;

Str. 73: Zwrot: ”odczyt płytek” → odczyt absorbancji roztworów;

Str. 82: Zwrot: „gdzie wartość tej frakcji stanowi do 20% osadów”?

Str. 83: „Oczyszczalnia (Gdańsk-Wschód) odprowadza około 35 040 000 tys. m<sup>3</sup> (ścieków) rocznie”???

Str. 84: „Oczyszczalnia (Dębogórze) odprowadza około 20 077 000 tys. m<sup>3</sup> (ścieków) rocznie”???. Podobnie dwie pozostałe oczyszczalnie;

Brak w tekście odniesienia do Rys. 33-37;

Str. 89: Co oznacza „wartość” w tabeli 12?

Str. 95: Zwroty „cyrkulacja” (czego?), „zmiennosc sezonowa” (czego?)

Str. 99: Zwrot „przedstawiono wyniki fizykochemiczne ścieków”

Tab. 22 i inne: Zamiast „najwyższe poziomy stężenie WWA” → „WWA o najwyższym poziomie stężeń”

Str. 106: Zwrot: „zawartość związków PCB” → z grupy PCB;

Str. 113: Zwrot „średnia toksyczność wynosiła 94%” → średni spadek luminescencji?

Str. 120: Zwrot „wyniki fitotoksyczności” → wyniki analizy fitotoksyczności

Str. 133: Tabela 35, zwrot „ocena zawartości poszczególnych WWA” → związków z grupy WWA

Str. 151, Rys. 100 zwrot: „w próbkach osadach dennych”

Str. 158 i inne „mediana toksyczności”?

Str. 166, Rys. 108 i inne: liczba bakterii czy liczba kolonii bakterii?

Str. 170: „przedstawiono na zestawiono w Tabelach...”

Str. 175: Zwrot „dla próbki kontrolnej o współrzędnych” → ze stacji o współrzędnych;

Str. 176: „jakości wód brzegowych” → przybrzeżnych;

Str. 177: „wymaganych w rozporządzeniu wielkości” (→ wartości); „Przedstawione danymi? pokrywają się z ...”;

Str. 181, Tytuł Tabeli 57: „Porównanie najwyższych dopuszczalnych wartości metali...” → stężeń metali?; „zestawienie danych literaturowych dotyczących na temat...”;

Str. 182: Zdanie „Próbki te są dobrze i bardzo dobrze posortowane” Czy chodzi o wysortowanie osadu?

Str. 183: Zwroty: „zmałał udział metali w środowisku ze źródeł powierzchniowych...”? „W krajach należących do Konwencji (?)...”. „średnie mierzone stężenie Cd ... zmałała...”;

Str. 185, Tabela 58: Zwrot „makroelement (Zn) pomaga w kontrolowaniu mechanizmów biochemicznych”?

Str. 186: Zwrot: „hamowanie kanałów jonowych” (?); „stężenie Gd na poziomie 2,47” – jaka jednostka?

Str. 201: Zwrot: „podwyższone wartości (stężeń) związków”

Str. 208: Tytuł tabeli powinien być na tej samej stronie co tabela 76;

Zwrot: „można wysunąć wnioski, że wskazuje, że próbki osadu...”

Str. 220: „problem ten już starają się już rozwiązać”

Str. 223 i inne „w badaniach identyfikacji związków...”. Czy można badać identyfikację związku?

### **Podsumowanie**

Przeprowadzenie oceny zagrożenia środowiskowego wynikającego z odprowadzania ścieków do Zatoki Gdańskiej uważam za zadanie ważne i ambitne, wymagające opanowania lub zapoznania się z różnymi metodami i narzędziami badań ekotoksykologicznych. Doktorant zadanie to wykonał rzetelnie.

Cele przedstawione w pracy na str. 44 zostały w pełni zrealizowane a uzyskane wyniki, ze względu na ich kompleksowy charakter, oceniam jako nowatorskie i wartościowe. Praca stanowi bogatą i wartościową bazę danych, które z pewnością powinny być udostępnione instytucjom odpowiedzialnym za stan sanitarny i ochronę środowiska. Za szczególnie wartościowe (ze względu na unikalność) uważam dane dotyczące występowania gadolinu oraz obecności grzybów. Przedstawione w pracy wyniki wskazują również, że mimo zgodności oznaczanych parametrów ścieków z obowiązującymi normami, dalsze udoskonalania technologii ich oczyszczania są wskazane. Ponadto, metoda oceny jakości ścieków odprowadzanych do środowiska powinna zostać zweryfikowana, ze względu na fakt pojawienia się (lub identyfikację istnienia) nowych zagrożeń.

### **Wniosek**

Pomimo krytycznej oceny strony edytorskiej pracy, wyrażam opinię, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane tego typu pracom, zgodnie z ustawą z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (z późniejszymi zmianami), dlatego też wnoszę do Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Wojciecha Ratajczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Gdańsk 9.11.2017

