

Warszawa 5 marca 2021

**Recenzja Rozprawy Doktorskiej mgr Eweliny Seta-Wiaderek**  
**pt: „Hybrydowe układy bioelektrokatalityczne do redukcji dwutlenku węgla”**

Rozprawa doktorska mgr Seta-Wiaderek opisuje badania nad wykorzystaniem biofilmu bakteryjnego wytworzonego z gatunku *Yersinia enterocolitica* i układów hybrydowych na nim opartych do modyfikacji powierzchni elektrod oraz ich zastosowania do procesu elektrokatalitycznej redukcji dwutlenku węgla. W ostatnich latach elektrochemicy coraz częściej sięgają po mikroorganizmy, aby wykorzystać zawarte w nich m.in. białka do konstrukcji ogniw paliwowych, baterii lub przygotowania warstwy receptorowej na elektrodzie. Praca wykonana została w Pracowni Elektroanalizy i Elektrokatalizy Chemicznej Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej pod kierunkiem prof. dr hab. Pawła Kuleszy.

Przedstawiona do recenzji praca jest opracowaniem w typowym układzie z podziałem na część literaturową oraz wyniki własne. Przegląd literatury rozpoczyna szczegółowy opis tworzenia biofilmu bakteryjnego poprzez proces adsorpcji bakterii na podłożu, konsolidacji oraz kolonizacji. Ma on trójwymiarową strukturę, która zapewnia przepływ składników odżywczych, a za jego stabilizację odpowiedzialna jest zewnętrzcząsteczkowa macierz polimeryczna. Ta trójwymiarowa struktura, składniki błon komórkowych bakterii oraz zewnętrzcząsteczkowa macierz polimeryczna wymienione są przez Autorkę jako elementy konieczne w kontekście przydatności biofilmów do modyfikacji powierzchni elektrod. Następnie omówiona została szczegółowo Gram-ujemna bakteria *Yersinia enterocolitica*. Autorka zwróciła szczególną uwagę na składniki wchodzące w skład ściany komórkowej i białka regulatorowe oraz ich rolę w tworzeniu biofilmu. Odporność w szerokim zakresie temperatur oraz pH zostały zaś przez nią wytypowane jako najistotniejsze czynniki uzasadniające wykorzystanie tej bakterii do badań elektrochemicznych. Kolejny rozdział pracy poświęcony został hybrydowym układom bioelektrochemicznym na bazie mikroorganizmów zdolnych do wymiany elektronu z powierzchnią elektrody; w szczególności zaś mikrobiologicznym ogniwom paliwowym, które wykorzystują biomasę do pozyskiwania energii elektrycznej. Ponadto mikroorganizmy stosowane są do procesów odsalania wody, czy redukcji dwutlenku węgla. Dość nieoczekiwanie w przeglądzie literaturowym autocytowana jest praca [141], jako przykład zastosowania mikroorganizmów do redukcji dwutlenku węgla. Zawartość merytoryczna tej publikacji jest częścią wyników własnych przedstawionych w rozdziale 10 „Biofilm bakteryjny oraz polianilina, jako alternatywna matryca dla nanocząstek platyny: wzmocnienie elektroredukcji dwutlenku węgla”. W przeglądzie literaturowym Autorka dużo uwagi poświęca mechanizmom przeniesienia ładunku pomiędzy mikroorganizmem a

powierzchnią elektrody, podkreślając rolę biofilmu i zwnętrcząsteczkowej macierzy polimerycznej w tych procesach. W kolejnym rozdziale przybliży czytelnikowi proces elektrokatalitycznej redukcji dwutlenku węgla. Szczegółowo przedstawia równania reakcji elektrodowych wraz z produktami powstającymi przy określonym potencjale, dyskutuje również wpływ pH i rodzaju rozpuszczalnika na rodzaj powstających produktów. Dodatkowo wspomina o konkurencyjnej reakcji wydzielania wodoru i przyjętej konwencji przedstawiania gęstości prądu netto uzyskanej dla redukcji dwutlenku węgla jako różnicy pomiędzy krzywymi dla danej elektrody zarejestrowanymi w odtlenionym elektrolicie i nasyconym dwutlenkiem węgla. Następnie Autorka skrupulatnie opisuje wybrane metaliczne katalizatory procesu redukcji dwutlenku węgla wraz z mechanizmami, podkreślając zarówno zalety, jak i wady tych materiałów. Końcowa część przedstawia układy oparte o aktywne katalitycznie biofilmy bakteryjne, które zostały wykorzystane do produkcji węglowych związków chemicznych na drodze redukcji dwutlenku węgla.

W mojej opinii część literaturowa jest dobrze napisana, podkreśla wszystkie poznane aspekty istotne z punktu widzenia niniejszej rozprawy, czyli zastosowania biofilmu bakteryjnego do modyfikacji powierzchni elektrod i badania procesu elektrokatalitycznej redukcji dwutlenku węgla w układach hybrydowych z nanocząstkami metali. Duża liczba schematów przedstawiony w pracy czynią ją bardzo czytelną. Ponadto Autorka dokonała rzetelnego przeglądu literaturowego.

W rozdziale poświęconym stosowanym metodom Autorka zwięźle opisała techniki elektrochemiczne, optyczne i spektroskopowe. Do tej części mam kilka drobnych uwag. Opisując równanie 2 Autorka nie podała wartości różnic potencjałów dla procesu odwracalnego i przykładowych wartości dla procesów nieodwracalnych. Podsumowała jedynie, że „Różnica potencjałów pików jest większa dla procesów nieodwracalnych.”, jeśli większa to od jakiej wartości. O ile zgadzam się ze stwierdzeniem zawartym na stronie 106, że fluorescencja jest zjawiskiem szybkim, to nie mogę się zgodzić z Autorką ze wskazanym przedziałem czasów zaniku emisji fluorescencji. W pracach naukowych należy unikać także skrótów myślowych tj. „... fluorofory tracą swoją zdolność do fluorescencji po oświetleniu” i wskazać przyczynę zmian właściwości optycznych molekuł.

Na początku części eksperymentalnej zestawione zostały informacje o warunkach hodowli bakterii, przygotowania biofilmu bakteryjnego i materiałach użytych do wytworzenia układów hybrydowych. Dodatkowo opisano przygotowanie próbek do analiz mikroskopowych oraz warunki eksperymentalne stosowane w doświadczeniach elektrochemicznych. W opisie przygotowania „tuszu” na bazie wielościennych nanorurek węglowych zabrakło jednostki przy nakładanej objętości „31  $\mu$ ” oraz informacji skąd wzięta się taka nietypowa objętość? W rozdziale tym nie znalazłam informacji na temat użytego barwnika do obrazowania za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej oraz opisu wybarwienia biofilmu bakteryjnego, używanego mikroskopu, w tym źródła wzbudzenia, filtrów i detektora. Dodatkowo nie

znalazłam procedury zabezpieczania biofilmu bakteryjnego Nafionem do badań elektrochemicznych.

Opis badań własnych rozpoczyna analiza obrazów skaningowej mikroskopii elektronowej biofilmu *Yersinia enterocolotica* na powierzchni elektrody z węgla szklanego po 48 h hodowli. Zgodnie z danymi literaturowymi obserwowana jest trójwymiarowa struktura biofilmu. Na podstawie tych obrazów została oszacowana również grubość biofilmu, która wynosiła od kilku do ok 20µm. W tym miejscu nasuwa mi się pytanie, czy SEM to adekwatna metoda wyznaczania grubości biofilmów bakteryjnych, które są uwodnione, a przygotowanie próbki do obrazowania następuje poprzez kilkustopniowe jej odwadnianie? Czy nie lepiej było zastosować mikroskopię optyczną do oceny grubości biofilmu? W całej rozprawie nie znalazłam także informacji czy 48h hodowla biofilmu prowadzi do powstawania powtarzalnych warstw?

Tak jak wspomniałam wcześniej brak jest podstawowych informacji do analizy map fluorescencji przedstawionych na Fot. E2, tj. zastosowany barwnik, długość fali wzbudzenia, czas akwizycji, czy rodzaj detektora oraz skali.

Do wstępnej charakterystyki elektrochemicznej uzyskanego biofilmu bakteryjnego Autorka wykorzystuje proces redukcji tlenu. Na podstawie analizy krzywych przedstawionych na rysunku E1 wyciąga wniosek, że w natlenionym roztworze obserwowana jest na elektrodzie redukcja tlenu przy potencjale -0,15V, natomiast proces ten nie zachodzi w odtlenionym roztworze. W tym miejscu brak jest krzywych zarejestrowanych w wyżej wymienionych warunkach na niemodyfikowanej elektrodzie z węgla szklanego. W pracy znajduje się jedynie informacja, że w odnośniku 143 „Dla porównania, na czystej elektrodzie z węgla szklanego w środowisku obojętnym omawiany proces przebiega ze znacznie większym nadpotencjałem, gdzie początek redukcji obserwowany jest zazwyczaj poniżej -0,6 V [143].” Niestety w cytowanej pracy krzywa ta również nie została przedstawiona. Proces redukcji tlenu zachodzi na niemodyfikowanej powierzchni elektrody z węgla szklanego i zależy od pH (np. J Solid State Electrochem (2005) 9: 601–608), dlatego uważam, że pominięcie tej krzywej w rozprawie doktorskiej jest błędem metodologicznym, a wyciągnięty wniosek, że „W badaniu potwierdzona została aktywność katalityczna stosowanego w pracy szczepu Ye9 w kierunku redukcji tlenu (Rys. E1).” jest trudny do weryfikacji. Za bardzo cenny uważam zaś informację, że za aktywność elektrokatalityczną biofilmu *Yersinia enterocolotica* mogą być odpowiedzialne białka Fur i OmpR, odpowiedzialne za kontrolę pobierania jonów żelaza (+3) do komórki bakteryjnej. Nie ukrywam, że umieszczenie tej informacji w celu pracy obok szerokiego zakresu odporności tego gatunku na zmianę temperatury i pH wzmocniłoby argument wyboru tej bakterii. Podrozdział 8.2.2. rozpoczyna zdanie „Ważnym zagadnieniem w projektowaniu systemów elektrokatalitycznych jest powtarzalność otrzymywanych wyników i trwałość badanej warstwy”, natomiast Autorka nie przedstawia w nim wyników dla kilku elektrod przygotowanych w ten sam sposób, co pozwoliłoby określić powtarzalność otrzymywanego biofilmu bakteryjnego i jego aktywność katalityczną.

Z przeprowadzonych pomiarów dla tego samego biofilmu po 14 dniach, dowiadujemy się, że układ nie ulega degradacji. W tym miejscu poprosiłabym Autorkę o wyjaśnienie jak należy interpretować wyniki badania mikrobiologicznego, z którego wynika, że w biofilmie procent żyjących bakterii wynosi tylko 0,11% (wyniki z tabeli E1).

W kolejnym kroku przeprowadzone zostały badania właściwości elektrochemicznych biofilmu *Yersinia enterocolotica* na elektrodzie z węgla szklanego w odtlenionym elektrolicie i po wysyceniu go dwutlenkiem węgla. W tym przypadku ponownie zabrakło krzywych odniesienia zarejestrowanych na niemodyfikowanej powierzchni elektrody z węgla szklanego w tych samych warunkach eksperymentalnych, gdyż proces redukcji dwutlenku węgla zachodzi na takiej elektrodzie (np. J. Electroanal. Chem. 421 (1997) 1-4). Dodatkowo, Autorka najpierw wysnuwa wnioski, następnie zaś opisuje kształt krzywych i różnice pomiędzy roztworem odtlenionym i wysyconym dwutlenkiem węgla. O ile w części literaturowej znajdziemy obszernie wyjaśnienia dotyczące reakcji konkurencyjnej do redukcji dwutlenku węgla, a mianowicie redukcji wodoru, w tym miejscu zastosowany jest ogromny skrót myślowy, który czyni ten fragment mało zrozumiałym, a jest on kluczowy dla całej rozprawy. Czy w tym przypadku wodór wykorzystany jest do konwersji dwutlenku węgla? Poprosiłabym też o komentarz, na jakiej podstawie Autorka wnioskuje, że za niewielką aktywność katalityczną odpowiedzialne „może być rozrzedzenie centrów aktywnych katalitycznie w stosunku do całej objętości matrycy biologicznej.”

W kolejnych rozdziałach opisane zostały układy hybrydowe, w których biofilm *Yersinia enterocolotica* posłużył jako matryca do unieruchamiania nanocząstek palladu, platyny i bimetalicznych nanocząstek platyny i rutenu w celu uzyskania wydajnego systemu do redukcji dwutlenku węgla. Dla wszystkich układów Autorka prezentuje w pierwszej kolejności elektrody GC modyfikowane nanocząstkami i porównuje je następnie z układami, w których są one umieszczone na biofilmie bakteryjnym. W tej części pracy znajdziemy systematyczny i wyczerpujący opis procesów zachodzących na poszczególnych elektrodach. Z analizy krzywych wynika, że obecność biofilmu na powierzchni elektrody wpływa na uzyskanie większych gęstości prądu reakcji redukcji dwutlenku węgla. Niestety do tej części mam również kilka uwag. Autorka konsekwentnie najpierw podaje wnioski, a następnie tłumaczy przebieg krzywych i zachodzące procesy. Nie zgadzam się również z Autorką, że pik redukcji dwutlenku węgla w przypadku nanocząstek palladu na biofilmie jest lepiej wykształcony w porównaniu, gdy są one unieruchomione na niemodyfikowanej elektrodzie; różni je tylko gęstość prądu i położenie maksimum piku. Aby zwiększyć porowatość powierzchni elektrody z węgla szklanego Autorka modyfikuje tę powierzchnie „modelowym polimerem”. W pracy nie podano grubości otrzymywanych warstw polimerowych oraz nie przedstawiono krzywej redukcji dwutlenku węgla dla takiego układu bez nanocząstek w celu wykluczenia, że sam polimer może być katalizatorem tej reakcji. Dlaczego nie wyznaczono prądów „netto” dla układów z nanocząstkami

platyny? Na koniec tego rozdziału zabrakło podsumowania i merytorycznej informacji dlaczego to nanocząstki platyny zostały wybrane do dalszych badań poza ogólnym stwierdzeniem, że „wzbudziły szczególne zainteresowanie i stanowiły argument do prowadzenia dalszych badań”.

Systematyczne badania wpływu poszczególnych składników układu hybrydowego złożonego z elektrody z węgla szklanego modyfikowanego warstwą polianiliny, biofilmu bakteryjnego, wielościennymi nanorurkami węglowymi i nanocząstkami platyny wskazują, że otrzymywane gęstości prądu redukcji dwutlenku węgla są najwyższe dla takiej wielowarstwowej struktury w porównaniu do układów cząstkowych. Świadczą o tym wartości gęstości uzyskanego prądu dla poszczególnych układów, które zestawiono w tabeli E2. Szczegółowa analiza poszczególnych kroków modyfikacji powierzchni elektrody dowodzi, że obecność biofilmu bakteryjnego przyczynia się do otrzymania większych gęstości prądu dla reakcji redukcji dwutlenku węgla poprzez zahamowanie reakcji wydzielania wodoru. Ku mojemu zaskoczeniu, w tej części pracy Autorka nie zaznaczyła, że prezentowane wyniki zostały już opublikowane i są cytowane jako referencja 141.

Za bardzo wartościowy uważam pomysł wprowadzenia kompleksu rutenu do biofilmu bakteryjnego poprzez dodatek tego składnika do pożywki, w której prowadzony był wzrost warstwy. Tak jak we wszystkich poprzednich układach brak jest krzywych odniesienia na elektrodzie z węgla szklanego w wybranych elektrolitach w warunkach odtlenionych i po nasyceniu dwutlenkiem węgla. Przy wyliczaniu stężenia ilości centrów aktywnych na powierzchni elektrody Autorka odnosi się do wartości otrzymanych w „warunkach absolutnych”, poprosiłabym o wyjaśnienie tego pojęcia.

Następnie Autorka przechodzi do badań elektrochemicznych elektrod modyfikowanych biofilmem bakteryjnym bez i zawierającym kompleks rutenu. Czy rysunek E3 i E25A przedstawiają te same krzywe? Czy biofilmy prezentowane na rys E 25 były zabezpieczane Nafionem, jeśli nie to dlaczego? Dodatek do pożywki kompleksu rutenu nie wpływa na wzrost biofilmu bakteryjnego, zaś jego obecność powoduje, że gęstość prądu na elektrodzie wzrasta niemal trzykrotnie dla badanej reakcji redukcji dwutlenku węgla. Modyfikacja biofilmu bakteryjnego nanocząstkami rutenu również prowadzi do wzrostu gęstości prądu w porównaniu do elektrody bez biofilmu. W pracy jest pewna niekonsekwencja, gdyż dopiero w kolejnym kroku przedstawione są analizy mające na celu weryfikację, czy kompleks rutenu został wprowadzony do biofilmu bakteryjnego. Z porównania zdjęć SEM znajdujących się na Fot. E9 Autorka wyciąga wniosek, że subtelne różnice pomiędzy biofilmami hodowanym bez i z kompleksem rutenu mogą świadczyć o inkorporacji tego związku. Według mnie na tej podstawie nie można tego ocenić. Nie potwierdza tego również mikroanaliza rentgenowska. Nie mogę się zgodzić z Autorką, że z porównania obrazów mikroskopii sił atomowych można wyciągnąć wniosek o obecności rutenu w biofilmie hodowanym w pożywce z dodatkiem kompleksu tego pierwiastka. W pracy zaprezentowane są pojedyncze zdjęcia, brak jest

informacji o ilości wykonanych obrazów i statystycznej analizie danych wysokości biofilmów bez i z dodatkiem kompleksu. Bez wątpienia zaś obecność rutenu w strukturze biofilmu bakteryjnego potwierdziła analiza z wykorzystaniem spektrometrii mas. Długotrwałe badania wskazują na wymywanie rutenu z warstwy, czy efekt ten zostałby zredukowany, gdyby elektroda zabezpieczona została Nafionem, tak jak to miało miejsce we wszystkich wcześniejszych przypadkach?

Ostatni rozdział części eksperymentalnej opisuje badania właściwości układów złożonych z tlenku miedzi(I) stabilizowanych biofilmem bakteryjnym bez i z dodatkiem kompleksu rutenu pod kątem zastosowania do procesu elektrokatalitycznej i fotoelektrochemicznej redukcji dwutlenku węgla. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że obecność biofilmu zabezpiecza warstwę tlenku miedzi(I) przed degradacją, ale sprzyja zachodzeniu konkurencyjnej reakcji wydzielania wodoru.

Końcowy rozdział w pracy przedstawia streszczenie każdego z rozdziałów prowadzonych badań, a pracę kończą dwa wnioski. Pierwszy, że biofilm bakteryjny *Yersinia enterocolotica* „sam z siebie może stanowić matrycę katalityczną ze względu na obecność w jego przestrzeni różnych enzymów”, co moim zdaniem nie zostało przekonywująco udowodnione w pracy, ze względu na brak zamieszczenia na woltamperogramach krzywych dla niemodyfikowanej elektrody z węgla szklatego. Drugi wniosek to, że biofilm bakteryjny może być wykorzystywany do unieruchamiania w nim katalitycznie aktywnych nanocząstek metali i kompleksów organometalicznych.

Po wnikliwej analizie wszystkich zaprezentowanych sposobów modyfikacji elektrod nasuwa się pytanie, czy w zaproponowanym tytule rozprawy doktorskiej nie jest nadużyciem zastosowanie zwrotu „układy bioelektrokatalityczne”, gdyż jak sama Autorka podkreśla we wnioskach o ile *Yersinia enterocolotica* tworzy biofilm, który jest dobrym podłożem do osadzania nanocząstek metalicznych użytych w procesie elektrokatalitycznym redukcji dwutlenku węgla, to poza układem z suplementowanym organometalicznym kompleksem rutenu nie wykazuje on własności katalitycznych wobec wspomnianej reakcji. Poproszę o komentarz.

W pracy w kilku miejscach wykorzystano niepoprawną terminologię zapożyczoną z innych działów, jak na przykład: wzmocnienie, wygaszanie pików, analiza diagnostyczna.

## Podsumowanie

Po zapoznaniu się z częścią literaturową niniejszej rozprawy doktorskiej można mieć pewność, że Autorka posiada bardzo dobre przygotowanie merytoryczne do prowadzonych przez siebie badań. W moim odczuciu rozprawa doktorska powinna stanowić spójny dokument, w którym w odróżnieniu od publikacji, nie można pomijać pomiarów prób referencyjnych lub odwoływać się do danych z publikacji wykonanych w innych warunkach eksperymentalnych, zwłaszcza w przypadku omawiania układów, w których przy



podobnych potencjałach zachodzą reakcje konkurencyjne. Tylko porównanie krzywych woltamperometrycznych dla niemodyfikowanej elektrody i w obecności katalizatora może wskazywać na zajście procesu bioelektrokatalitycznego i pozwala na wysunięcie poprawnych wniosków. Niemniej jednak w pracy zaprezentowano nowe rozwiązanie polegające na wytworzeniu biofilmu bakteryjnego *Yersinia enterocolitica* i zastosowaniu go jako matrycy do unieruchamiania nanocząstek metali katalizujących proces redukcji dwutlenku węgla na elektrodzie z węgla szklanego. Wykazano, że obecność tego biofilmu hamuje konkurencyjny proces redukcji wodoru, który zachodzi w podobnym zakresie potencjałów. Jest to także najlepiej zaprezentowana i przeanalizowana część pracy. Część uzyskanych w niniejszej pracy wyników została opublikowana w pracy, która ukazała się w Australian Journal of Chemistry w 2016 roku. W związku z powyższym, uważam, że rozprawa doktorska mgr Eweliny Sety-Wiaderek pt. „Hybrydowe układy bioelektrokatalityczne do redukcji dwutlenku węgla” spełnia warunki określone w ustawie 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 z późniejszymi zmianami). Na tej podstawie wnioskuję o dopuszczenie mgr Eweliny Sety-Wiaderek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Joanna Niedziółka-Jönsson