

Dr hab. inż. Anna Małachowska-Jutsz  
Katedra Biotechnologii Środowiskowej  
Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki  
Politechnika Śląska w Gliwicach

Gliwice, 10.09.2017

## **Recenzja**

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Zuzanny Justyny SZCZEPANIAK

**pt. „Analiza wpływu bioaugmentacji i biosurfaktantów na zmiany populacyjne mikroorganizmów oraz biodegradację wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w środowisku glebowym”**

Promotor: dr hab. inż. Agnieszka Piotrowska-Cyplik

### **1. Podstawa opracowania recenzji**

Recenzja została opracowana w związku z Uchwałą Rady Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z dnia 26 stycznia 2017 r., wyrażoną na piśmie przez Dziekana Wydziału – dr hab. Bożenę Danyluk – z dnia 28.07.2017 r.

### **2. Celowość podjęcia tematu**

Zagadnienia związane z zanieczyszczeniem gleb substancjami chemicznymi w ostatnim czasie uznaje się za priorytetowe. Świadczą o tym liczne konferencje, sympozja czy podstawowy dokument Unii Europejskiej w zakresie ochrony środowiska glebowego, tzw. Strategia tematyczna w dziedzinie ochrony gleby (*Thematic Strategy for Soil Protection*), która wskazuje na konieczność zachowania głównych funkcji gleb oraz ich ochrony przed najistotniejszymi zagrożeniami takimi jak: ubytek materii organicznej, erozja, zanieczyszczenia i zmiany bioróżnorodności. W przypadku terenów wykorzystywanych rolniczo, istotne znaczenie mają funkcje produkcyjna, retencyjna i siedliskowa. Funkcja

siedliskowa związana jest z bioróżnorodnością, a jednym z najpoważniejszych zagrożeń dla siedliskowych funkcji gleb użytkowanych rolniczo jest zanieczyszczenie szkodliwymi substancjami chemicznymi, w tym związkami organicznymi z grupy WWA. Zanieczyszczenia te stanowią ogromną grupę związków o zróżnicowanych właściwościach, stąd trudność w ich degradacji. Dotychczasowe doświadczenia wykazują, że zastosowanie technik biologicznego oczyszczania gruntów zanieczyszczonych wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi jest najbardziej racjonalnym sposobem ich rekultywacji. Z uwagi na stosunkowo niskie koszty oraz wysoką skuteczność, metody te znajdują w dzisiejszych czasach zastosowanie na skalę techniczną, ponadto cieszą się akceptacją społeczną. Wśród metod biotechnologicznych istotną rolę odgrywają metody bioaugmentacji wspomagane dodatkiem surfaktantów. Ponieważ dane na temat wpływu surfaktantów i bioaugmentacji na rozkład węglowodorów nie są jednoznaczne, a czasami wręcz sprzeczne, tak więc oceniana praca trafnie wpisuje się we współczesny nurt badań, prowadzonych w wielu ośrodkach naukowych krajowych i zagranicznych, dotyczących podniesienia efektywności degradacji WWA i wypełnia tę lukę.

### **3. Ogólna charakterystyka rozprawy**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Zuzanny Justyny SZCZEPANIAK liczy 143 strony. Część przeglądowa stanowi ok. 33% pracy, część eksperymentalna wraz z uzyskanymi wynikami ok. 37%, dyskusja wyników badań ok. 8%, pozostałą część stanowią wnioski i bibliografia oraz dorobek własny Autorki. W bardzo obszernej bibliografii obejmującej 184 pozycje literatury jedynie ok. 9% stanowią doniesienia w języku polskim. 60% stanowią oryginalne i przeglądowe publikacje naukowe z ostatnich 10 lat.

Praca posiada tradycyjny układ obejmujący 11 podstawowych rozdziałów (*Wprowadzenie – Część literaturowa – Hipotezy badawcze – Cel pracy i zadania badawcze (Roz. 1-4) – Materiały i metody – Wyniki badań wraz z ich omówieniem – Dyskusja wyników - Wnioski – Literatura – Streszczenie – Dorobek własny (rozd. 5-11)*). Materiał ilustracyjny obejmuje 43 rysunki i 15 tabel i w sposób przejrzysty i wyczerpujący opisuje otrzymane wyniki badań.

### **4. Ocena merytoryczna rozprawy**

Nadrzędnym celem badań naukowych prowadzonych przez mgr inż. Zuzannę Justynę SZCZEPANIAK i przedstawionych w Jej rozprawie doktorskiej pt. „Analiza wpływu

bioaugmentacji i biosurfaktantów na zmiany populacyjne mikroorganizmów oraz biodegradację wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w środowisku glebowym” była ocena wpływu bioaugmentacji oraz dodatku biosurfaktantów na rozkład WWA, na aktywność metaboliczną mikroorganizmów oraz na zmiany populacyjne, a także analiza ekotoksykologiczna zanieczyszczeń dokonana na poziomie reducentów i producentów. Uważam, że problemy prezentowane w ocenianej pracy są ważne i aktualne. Dysertacja posiada tradycyjny układ. Została podzielona na logicznie ułożone, wzajemnie ze sobą korespondujące rozdziały.

We wstępie (rozdz. 1) Autorka naświetliła wagę podjętego problemu.

W Rozdziale 2 na podstawie bogatej bibliografii, dokonała przeglądu aktualnego stanu wiedzy, z zakresu związanego z tematem rozprawy. Przedstawiła m.in. skalę występowania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w środowisku naturalnym, ich charakterystykę, drogi wnikania WWA do organizmów żywych i ich toksyczność, metody remediacji terenów zanieczyszczonych ze szczególnym uwzględnieniem metod biologicznych. Autorka w kolejnych podrozdziałach wskazała na czynniki wpływające na szybkość procesu oczyszczania gruntów zanieczyszczonych WWA. Podrozdział 3 został poświęcony bioaugmentacji, w tym czynnikom wpływającym na jej efektywność, mikroorganizmom stosowanym w tym procesie, technologiom wprowadzania mikroorganizmów na tereny zanieczyszczone. Podrozdział 4 został w całości poświęcony surfaktantom i ich wykorzystaniu przy wspomaganie procesów remediacji terenów zanieczyszczonych węglowodorami. Autorka przedstawiła zarówno wady, jak i zalety takiego rozwiązania. Przegląd danych z piśmiennictwa jest wyczerpujący, treści zawarte w cytowanych pracach zostały umiejętnie wykorzystane.

Rozdział 3 przedstawia Hipotezy Badawcze, w których Autorka podnosi zasadność zwrócenia szczególnej uwagi na celowość stosowania bioaugmentacji w procesach bioremediacyjnych, tym bardziej, że badania naukowe w tej kwestii nie są jednoznaczne. Autorka na podstawie studium literatury sformułowała w Rozdziale 4 swoje Cele i Zadania Badawcze. Celem badań było określenie wpływu strategii wspomagających bioremediację wykorzystujących konsorcjum mikrobiologiczne oraz dodatek ramnolipidów. Cel nadrzędny realizowany był poprzez zadania badawcze obejmujące:

- zbadanie wpływu wyselekcjonowanych czterech szczepów grzyba *Trichoderma viride* na efektywność biodegradacji prowadzonej przez konsorcjum bakteryjne,
- wyznaczenie zmian aktywności metabolicznej mikroorganizmów,
- analiza zmian meta populacyjnych,

- określenie wpływu ramnolipidów na efektywność ekstrakcji WWA z gleby trwale zanieczyszczonej olejem kreoizotowym,
- określenie toksyczności oraz cytotoxycznosci ramnolipidów i ekstraktów glebowych wobec wybranych grup reducentów i producentów.

Biorąc powyższe pod uwagę, należy uznać trafność przyjętego tematu rozprawy doktorskiej tak z poznawczego, jak i uytliarnego punktu widzenia, a jednocześnie dużą złożoność merytoryczną i trudności metodyczne w jej realizacji. Dążąc do wyznaczonego celu badawczego Autorka zaplanowała i zrealizowała szeroki cykl badań w warunkach laboratoryjnych.

W Rozdziale 5, zatytułowanym Materiały i metody, przedstawiono sposoby realizacji badań doświadczalnych dotyczących zastosowania biosurfaktantów i bioaugmentacji oraz wpływu grzybów *Trichoderma viride* na mikroorganizmy glebowe w remediacji gleb zanieczyszczonych WWA. Zaprezentowano też charakterystykę gleby użytej podczas badań, ramnolipidów, konsorcjum mikrobiologicznego, warunki prowadzenia doświadczeń. W Rozdziale tym zawarto również opis procedur wykonywania analiz chromatograficznych, oznaczania aktywności metabolicznej mikroorganizmów, ich identyfikację, procedur mających na celu oznaczenie toksyczności ekstraktów i ramnolipidów względem reducentów i producentów, oznaczenie mutagenności, cytotoxycznosci. Autorka wykorzystwała tu wiele nowoczesnych technik i metod badawczych. Szkoda, że niektóre z nich nie są dość precyzyjnie opisane co sprawia, że powtórzenie tych doświadczeń byłoby niemożliwe.

Wyniki przeprowadzonych badań Autorka przedstawiła w Rozdziale 6 w formie tabel i rysunków (jako wykresy ilustrujące badane zależności) wraz z ich opracowaniem matematycznym.

Rozdział 7 zawiera dyskusję nad wynikami badań własnych oraz podsumowanie uzyskanych efektów.

W kolejnym Rozdziale rozprawy przedstawiono 8 wniosków, charakteryzujących wykonane badania i ich rezultaty.

Za główne osiągnięcia mgr inż. Zuzanny Justyny SZCZEPANIAK uważam wykazanie, iż:

- zastosowanie bioaugmentacji oraz dodatku biosurfaktantów prowadziło do zwiększenia degradacji WWA (zwłaszcza 4-o i 5-cio pierścieniowych) w początkowym okresie procesu
- ramnolipidy stanowiły łatwo dostępne źródło węgla dla mikroorganizmów przyczyniając się tym samym do efektywniejszej degradacji WWA

- potwierdzenie pozytywnego wpływu dodatku konsorcjum bakteryjnego na wydajność biodegradacji
- *Trichoderma viride* posiada zdolność biodegradacji WWA. Jednakże ze względu na silne właściwości antybakteryjne tego grzyba, zaobserwowano zahamowanie procesu biodegradacji w kombinacji gleba+ WWA + M+ *T.viride*
- ramnolipidy mogą działać toksycznie w określonych stężeniach w stosunku do mikroorganizmów osadu czynnego oraz producentów, ponadto mogą zwiększać biodostępność związków toksycznych
- w środowisku glebowym wraz z upływem czasu następuje proces samooczyszczania oraz powrót struktur metapopulacyjnych do stanu wyjściowego
- zastosowanie bioaugmentacji lub dodatku surfaktantów nie jest uzasadnione w środowisku glebowym „dawno” zanieczyszczonym.

Strona formalna pracy generalnie nie budzi zastrzeżeń, choć w tekście pojawiły się drobne literówki, przeoczenia. Studium literatury zostało przeprowadzone w sposób rzeczowy i ciekawy i uwzględnia ono najnowszą literaturę przedmiotu, o istotnym znaczeniu dla rozwoju badań nad oczyszczaniem gruntów skażonych węglowodorami. Całość wskazuje na wysokie kompetencje mgr inż. Zuzanny Justyny SZCZEPANIAK w zakresie podjętej problematyki badawczej. Całą rozprawę oceniam pozytywnie. Zagłębiając się w szczegóły rozprawy znalazłam kilka mankamentów wymagających dodatkowych wyjaśnień.

## 5. Uwagi dyskusyjne i wątpliwości

1. Dlaczego w doświadczeniu dotyczącym wpływu zastosowania biosurfaktantów i bioaugmentacji w remediacji gleb zanieczyszczonych węglowodorami stosowała Pani inne stężenia WWA w porównaniu z doświadczeniem, którego celem było określenie wpływu grzybów *Trichoderma viride* na ten proces?
2. Jaki był odczyn gleb zastosowanych w badaniach. Jak wiadomo ma on kluczowy wpływ na przebieg procesów bioremediacji poza tym decyduje również w głównej mierze o składzie mikroorganizmów zasiedlających to środowisko.
3. W eksperymencie z użyciem biosurfaktantów i szczepionki bakteryjnej w remediacji gleb p. 7.1 nie podaje Pani nigdzie informacji ile mikroorganizmów wprowadzała Pani na próbkę gleby. Znalazłam jedynie informację, że w 1 ml konsorcjum mikrobiologicznego znajdowało się  $10^6$  jtk/ml. A ile ml wprowadzano do gleby?

4. Str. 53 – p. 7.2 podane stężenie WWA i ilość rozpuszczalnika użytego podczas badań są błędne.
5. W opisie przygotowania próbek do analizy chromatograficznej zabrakło mi informacji na temat stężeń wzorców stosowanych do analizy, oraz innych odczynników stosowanych podczas analizy co sprawia, że nie byłoby możliwości powtórzenia w/w badań.
6. W opisie analiz chromatograficznych nie znalazłam nigdzie informacji czy wyznaczyła Pani współczynnik sorpcji węglowodorów – co przy tak znacznym udziale iltu oraz substancji organicznej w analizowanej glebie ma niebagatelne znaczenie.
7. Pewne niedogodności w odbiorze lektury budzi również fakt, że procedura przygotowania próbek gleby i ekstraktów glebowych do analizy GC-MS i analiza GC-MS zostały rozdzielone kilkoma podrozdziałami niezwiązanymi z tą analizą.
8. W metodyce oznaczania toksyczności względem mikroorganizmów osadu czynnego metodą testu TTC część procedury wymaga doprecyzowania. Po ekstrakcji powstałego TF etanolem, próbkę należałoby ponownie odwirować i zmierzyć ekstynkcję supernatantu. Pojawił się również błąd w istocie samej metody, ponieważ TTC jest związkiem bezbarwnym i rozpuszczalnym w wodzie, a powstały w wyniku reakcji enzymatycznej jego produkt TF jest barwny i nierozpuszczalny w wodzie.
9. Rozdział 8 – Metody badawcze – podrozdział 8.1 Oznaczenie biodegradacji WWA – nie ma w tym akapicie żadnej wzmianki na ten temat – natomiast jest tu informacja na temat przygotowania próbek do analizy chromatograficznej.
10. W metodyce badań nie zamieściła Pani danych w ilu powtórzeniach były przeprowadzone badania, z jakim prawdopodobieństwem oceniano istotność różnic pomiędzy uzyskanymi wynikami badań?
11. Str. 78 – w omówieniu wyników badań pojawia się informacja, że w celu określenia wpływu bioaugmentacji, biosurfaktantów i metody łączonej na aktywność metaboliczną mikroorganizmów wykonano analizy cystometrii przepływowej, a uzyskane wyniki przedstawiono w postaci parametru %Q2, czyli procentu populacji komórek najbardziej aktywnych metabolicznie (o najwyższym potencjale oksydoredukcyjnym). Czy może Pani doprecyzować do jakiej wartości E [V] zaliczała Pani komórki do najbardziej aktywnych metabolicznie.
12. W opisie rys. 6-17 przy określaniu stężenia WWA użyła Pani sformułowania: WWA [mg/próba]. Próbka to nie jest jednostka w układzie SI.

13. Zgadzam się z twierdzeniem, że w przypadku trzech węglowodorów nie było możliwości obliczenia czasu półtrwania związku, co wynikało z faktu, że związki te wg ekstrapolacji wykreślonych krzywych nie ulegają biodegradacji w czasie dłuższym niż 12 miesięcy. Jak należałoby zaplanować eksperyment aby była możliwość wyznaczenia stałych szybkości reakcji. W jaki sposób liczyła Pani okresy półtrwania związków?
14. Str. – 96-98 – co dokładnie przedstawiają te wykresy? Czy jest to % inhibicji wzrostu w stosunku do kontroli? Jeżeli tak to co przedstawiono na rys. 35, 37, 39?

## 6. Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowując recenzję pracy doktorskiej mgr inż. Zuzanny Justyny SZCZEPANIAK oceniam pozytywnie przeprowadzony kompetentnie przegląd aktualnego stanu wiedzy w zakresie problematyki poruszanej w rozprawie, jak i bogatą część doświadczalną. Uwagi zawarte w pracy mają charakter polemiczny i nie wpływają na moją pozytywną ocenę omawianej rozprawy doktorskiej. W moim przekonaniu, przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Zuzanny Justyny SZCZEPANIAK pt. ” Analiza wpływu bioaugmentacji i biosurfaktantów na zmiany populacyjne mikroorganizmów oraz biodegradację wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w środowisku glebowym”, wykonana pod opieką naukową promotora – dr hab. inż. Agnieszki Piotrowskiej-Cyplik, spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 r. (z późniejszymi zmianami).

Uwzględniając powyższe, wnioskuję o przyjęcie recenzowanej rozprawy przez Radę Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu i dopuszczenie jej Autorki do publicznej obrony rozprawy.

