



Poznań 28.09.2017 r.

dr hab. Agnieszka Wolna-Maruwka  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
Katedra Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej  
ul. Szydlowska 50  
60-656 Poznań  
tel.0618466724  
email: [amaruwka@up.poznan.pl](mailto:amaruwka@up.poznan.pl)

## 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”**

Tematyka badań podjętych przez panią mgr Zuzannę Szczepaniak dotyczy niezwykle ważnego problemu, związanego z zastosowaniem mikroorganizmów w usuwaniu wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych z gleby.

WWA wykazują stosunkowo dużą trwałość w środowisku. Charakteryzują się silnymi właściwościami hydrofobowymi i lipofilowymi, słabą rozpuszczalnością w wodzie, małą lotnością, jak również silnym powinowactwem sorpcyjnym, w stosunku do glebowej substancji organicznej. Niniejsze zanieczyszczenia dostając się do gleby przyczyniają się do wzrostu zawartości węgla organicznego, destabilizują roztwory koloidalne, pogarszają strukturę gruzelkową gleby, przez co zmieniają stosunki powietrzno-wodne i niejednokrotnie doprowadzają do zaburzenia równowagi biologicznej gleby.

W celu odnowy środowiska podejmowane są działania polegające na likwidacji zanieczyszczeń oraz na przywróceniu pierwotnych właściwości gleby. Usuwanie szkodliwych środowiskowo związków najczęściej przeprowadza się przy użyciu metod fizycznochemicznych, jednakże

przywrócenie równowagi biologicznej gleby można uzyskać jedynie przez zastosowanie technik biologicznych.

Praca doktorska pani mgr Zuzanny Szczepaniak została przygotowana w sposób typowy dla doktorskich prac eksperymentalnych. Liczy 143 strony i składa się z jedenastu rozdziałów (Wprowadzenie, Część literaturowa, Hipotezy badawcze, Cel pracy i zadania badawcze, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Literatura, Streszczenie oraz Dorobek własny). W tekst rozprawy wkomponowano 43 rysunki i 15 tabel.

W rozdziale „Wprowadzenie” Doktorantka porusza zagadnienia dotyczące właściwości toksycznych WWA oraz działań mających na celu ich eliminację ze środowiska glebowego, ze szczególnym uwzględnieniem procesu bioaugmentacji.

W „Części literaturowej” przedłożonej do oceny dysertacji Autorka w interesujący sposób przybliżyła skalę problemu zanieczyszczenia środowiska wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi oraz ich budowę chemiczną. Następnie wprowadza w zagadnienia związane z remediacją terenów zanieczyszczonych produktami ropopochodnymi. Dużo uwagi poświęca wpływom bioaugmentacji i biosurfaktantów na biodegradację węglowodorów, udowadniając że obserwacje naukowców na temat bioremediacji nie są jednoznaczne, a czasami wręcz sprzeczne, a tym samym podkreśla celowość podjętych badań własnych.

Poszukując odpowiedzi na zarysowany problem badawczy pani mgr inż. Zuzanna Szczepaniak sformułowała trzy hipotezy badawcze, które korespondują z prezentowaną tematyką badawczą.

Doktorantka postawiła sobie ambitny cel - określenie wpływu bioaugmentacji z użyciem wyselekcjonowanego konsorcjum mikrobiologicznego oraz dodatku biosurfaktantów na 12-miesięczny proces bioremediacji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w glebie. Niniejszy cel realizowała poprzez szereg innowacyjnych analiz i ekspertyz, które opisała w rozdziale „Materiały i metody”.

Zastosowane przez mgr Zuzannę Szczepaniak badania charakteryzują się dużym potencjałem badawczym i aplikacyjnym. Realizując cel badań Autorka opanowała wiele technik badawczych, wprowadziła ponadto nowatorskie zastosowania niektórych metod, w celu dokonywania oznaczeń w próbkach środowiskowych. Świadczy to o dużym zasobie wiedzy w tematyce badawczej oraz ogromnym zaangażowaniu w realizację zaplanowanych doświadczeń.

W ramach badań mgr Zuzanna Szczepaniak badała wpływ biosurfaktantów i bioaugmentacji na efektywność biodegradacji WWA w glebie, na zmiany populacyjne i aktywność metaboliczną mikroorganizmów. Liczba jtk w 1ml zastosowanego przez Doktorantkę w procesie bioremediacji konsorcjum mikrobiologicznego, które wyizolowano z terenów roponośnych południowo-wschodniej Polski wynosiła  $10^6$ , nie podano jednak ile ml zawiesiny mikroorganizmów wprowadzano do danego obiektu doświadczalnego. Interesuje mnie również, czy zastosowane

dawki WWA wprowadzano na kg suchej, czy świeżej masy gleby? (rozdział „Materiały i metody”, str. 50).

Biodegradację WWA analizowano pięciokrotnie, w ciągu dwunastomiesięcznego doświadczenia, stosując analizę GC-MS, natomiast zawartość ramnolipidów określano analizą HPLC-MS/MS z zastosowaniem chromatografu UltiMate 3000 RSLC.

Na uwagę zasługuje nowatorskie zastosowanie cytometrii przepływowej w analizie próbek środowiskowych, a mianowicie w oznaczeniu aktywności metabolicznej mikroorganizmów. Dzięki niniejszej analizie możliwa była obserwacja zarówno aktywności metabolicznej, jak i zmienności populacyjnych poszczególnych gatunków mikroorganizmów. Natomiast w celu określenia zmian metapopulacyjnych w glebie Doktorantka dokonała analizy genu 16S rRNA, która umożliwia szybką i precyzyjną identyfikację bakterii w próbkach środowiskowych.

Powyższe analizy pod względem metodycznym zaprojektowano i wykonano poprawnie i rzetelnie. Nie podano jednak w ilu powtórzeniach je wykonywano, jak również w ilu powtórzeniach założono poszczególne warianty doświadczalne. W podrozdziale dotyczącym analizy bioinformatycznej danych z sekwencjonowania podano natomiast, że obliczono wskaźniki Alfa różnorodności, nie powołując się na żadne źródło literaturowe (taka informacja pojawia się dopiero w rozdziale „Wyniki”) i nie przybliżając sposobu obliczania niniejszych indeksów.

W ramach niniejszej dysertacji Autorka zaplanowała kolejne doświadczenia, które logicznie i konsekwentnie realizowała. Jedno z nich dotyczyło analizy wpływu *Trichoderma viride* i konsorcjum mikrobiologicznego na biodegradację WWA, jak również na aktywność metaboliczną i zmiany populacyjne mikroorganizmów glebowych. Celem kolejnego eksperymentu była natomiast charakterystyka zanieczyszczeń organicznych w glebie i ekstraktach, jak również określenie toksyczności ramnolipidów i ekstraktów glebowych wobec organizmów modelowych. Zakres przeprowadzonych analiz jest bardzo szeroki i pragnę podkreślić, że wymagał od Doktorantki dużego nakładu pracy. Próbuąc określić toksyczność zastosowanych w doświadczeniu biosurfaktantów posłużyła się precyzyjnymi i czułymi metodami. Za testy wskaźnikowe przyjęła test TTC, który umożliwia określenie reakcji mikroorganizmów osadu czynnego na podstawie poziomu aktywności dehydrogenaz. Fitotoksyczność badanych substancji określała na podstawie komercyjnych testów typu phytotestkit, uznając za rośliny testowe nasiona sorga dwubarwnego, gorczycy białej i pieprzycy siewnej. Do oznaczenia mutagenności analizowanych substancji zastosowała test Amesa, oparty na czterech, zmodyfikowanych genetycznie szczepach bakterii *Salmonella typhimurium*. Natomiast oznaczenie cytotoksyczności wykonano z wykorzystaniem testu MTT, opartym na pomiarze przemian energetycznych we wnętrzu mitochondriów limfoblastów i fibroblastów.

Uzyskane wyniki badań pani mgr Zuzanna Szczepaniak poddała analizie statystycznej, posługując się programami Statistica wersja 6.0 oraz SigmaPlot wersja 12.3.

Chciałabym się jednak dowiedzieć jakie obiekty i jakie zmienne badano analizą wariancji i testem Tukeya, a jakie testem Kruskala-Wallisa?

Szeroko zakrojone badania zaowocowały dużą liczbą wyników, które Doktorantka przedstawiła na 35 stronach pracy. Wyniki zaprezentowała w sposób przejrzysty i czytelny, co pozwoliło na poszerzenie wiedzy na temat wpływu bioaugmentacji i biosurfaktantów na biodegradację wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oraz na zmiany populacyjne mikroorganizmów w środowisku glebowym. Do najważniejszych walorów merytorycznych niniejszej dysertacji zaliczam wykazanie, że:

1. Zastosowane konsorcjum mikrobiologiczne wpływało pozytywnie na wydajność biodegradacji WWA w początkowych etapach doświadczenia, pomimo obniżenia aktywności metabolicznej mikroorganizmów.
2. Ramnolipidy przyczyniały się do efektywnej biodegradacji WWA w glebie. Potwierdzono jednak ich właściwości toksyczne oraz wzrost toksyczności zanieczyszczeń organicznych w ich obecności.
3. *Trichoderma viride* wykazała zdolność do rozkładu WWA, z drugiej jednak strony udowodniono jej właściwości antybakteryjne, co przełożyło się na hamowanie biodegradacji WWA przez konsorcjum, a także zmniejszenie bioróżnorodności mikrobiologicznej w środowisku glebowym.
4. Ponadto wykazano uzasadnione zastosowanie techniki dodatku mikroorganizmów i/lub biosurfaktantów w razie konieczności szybkiego oczyszczania środowiska. W przypadku braku presji czasu zastosowanie powyższych techniki ze względu na tendencję środowiska do samooczyszczania może nie być uzasadnione.

W kolejnym rozdziale „Dyskusja” Doktorantka przeprowadziła wnikliwą dyskusję uzyskanych wyników, odnosząc się do rezultatów badań innych badaczy. Rozdział ten wskazuje na dużą dojrzałość naukową Doktorantki, zdającej sobie sprawę z wielu problemów metodycznych i trudności w interpretacji uzyskanych wyników badań. Zaletą tego rozdziału jest komunikatywne przedstawienie najważniejszych osiągnięć oraz zaakcentowanie najcenniejszych wyników badań.

Merytoryczna część pracy kończy się prawidłowo sprecyzowanymi wnioskami, które korespondują z celem pracy. Do najważniejszych wniosków w doświadczeniu polowym zaliczam wnioski nr 1, 3, 5 oraz 8.

Bibliografia obejmuje łącznie 184 pozycje literaturowych, z przewagą anglojęzycznych. W niniejszym rozdziale ujęte zostały najbardziej aktualne publikacje naukowe, w pełni nawiązujące do tematu badań. Dobra znajomość literatury przedmiotu wskazuje na dobre przygotowanie Doktorantki do pracy naukowej.

Reasumując stwierdzam, że problematyka podjęta przez panią mgr Zuzannę Szczepaniak jest ważna z punktu widzenia poznawczego i aplikacyjnego. Autorka wykazała, że posiada teoretyczną wiedzę z zakresu nauk biotechnologicznych, umiejętność samodzielnego prowadzenia prac badawczych oraz prawidłowej interpretacji uzyskanych wyników badań. Pod względem merytorycznym pracę oceniam bardzo wysoko.

O dużej dojrzałości naukowej Doktorantki świadczy również jej dorobek naukowy, na który składa się 16 publikacji, w tym 4 z Listy Filadelfijskiej, o łącznym IF równym 11,38. Z obowiązku recenzenta niniejszej rozprawy doktorskiej zgłaszam poniższe uwagi, które nie wpływają na wartość ocenianej pracy, a jedynie mają służyć lepszemu przygotowaniu wyników badań do publikacji:

1. Dyskusyjne wydaje się nazewnictwo niektórych określeń użytych w pracy: na przykład zamiast „próba gleby” stosuje się termin „próbka gleby”, zamiast „spadek aktywności” - „zmniejszenie aktywności”, zamiast „ilość DNA” - „stężenie uzyskanego DNA”.
2. Jednostki złożone utworzone przez pomnożenie lub podzielenie jednostek prostych należy zapisywać w postaci iloczynu potęg na przykład:  $g \cdot kg^{-1}$ , zamiast g/kg (wg. Ważniejsze Jednostki Miar i Symbole Stosowane W Naukach O Glebie, PAN Warszawa)
3. Rozdział „ Wyniki”, str. 81, na wykresie nr 21 przedstawiono wariant Gleba+M, o którym nie wspomiano w rozdziale „Materiały i metody”.
4. Nie podano, czy na prezentowanych wykresach „wąsy” oznaczają odchylenie standardowe, czy przedział ufności.
5. W wykazie literatury - pozycje nr 14, 15, 53, 64, 124, 139 nie podano nazwy czasopisma lub numerów stron.
6. Rozdział „Literatura” – str. 122 nie ułożono alfabetycznie cytowanych pozycji literaturowych.
7. Pozycja literaturowa Van Shooten i in. 1997 (rozdział „Część literaturowa”, str. 19) – nie podano pozycji w wykazie literatury.
8. Przykładowe błędy edytorskie i stylistyczne:
  - strona 6 wiersz 30,
  - strona 7, wiersz 24
  - strona 9, wiersz 31
  - strona 51, wiersz 24
  - strona 58, wiersz 7
  - strona 66, wiersz 14 i 15

### **Wniosek końcowy**

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa pani mgr inż. Zuzanny Szczepaniak pt „Analiza wpływu bioaugmentacji i biosurfaktantów na zmiany populacyjne mikroorganizmów oraz bio-

degradację wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w środowisku glebowym” stanowi oryginalne osiągnięcie naukowe i w pełni spełnia wymagania Ustawy o Stopniach i Tytułach Naukowych z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami. W związku z powyższym wnoszę do Rady Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu wniosek o dopuszczenie pani mgr Zuzanny Szczepaniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*J. Wolna-Moniuska*