

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Agnieszki Wolniewicz,

pt. **Analiza czynników determinujących efektywność degradacyjną biopreparatów  
mikrobiologicznych wykorzystywanych w remediacji środowiska zanieczyszczonego  
węglowodorami**

promotor: dr hab. Roman Marecik, prof. UPP

### 1. Charakterystyka rozprawy doktorskiej

Recenzja dysertacji Pani mgr inż. Agnieszki Wolniewicz została wykonana w oparciu o materiały przesłane przez Pana prof. dr hab. Mariusza Sojkę, Przewodniczącego Rady Naukowej dyscypliny inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Wyniki ww. pracy powstały w wyniku realizacji I edycji konkursu w programie MNiSW „Doktorat wdrożeniowy”, realizowanego przez WNoŻiŻ UPP w latach 2017-2021 na podstawie umowy zawartej przez ww. jednostkę naukową i firmę ATP Eko Serwis sp. z o.o. z siedzibą w Poznaniu.

Rozprawa doktorska ma układ typowy dla prac badawczych, zawiera kolejno: streszczenie, *summary*, wstęp, przegląd literatury, część doświadczalną, zawierającą opis celu i hipotez badawczych oraz metodykę przeprowadzonych analiz, omówienie uzyskanych wyników badań, dyskusję wyników, wnioski, bibliografię, spis tabel, rysunków oraz załączniki.

Nadrzędnym celem rozprawy doktorskiej było opracowanie wytycznych umożliwiających pozyskanie i efektywne wykorzystanie biopreparatów mikrobiologicznych do remediacji terenów zanieczyszczonych węglowodorami. W ramach pracy podjęto próbę weryfikacji **hipotezy** badawczej, negującej zasadność wprowadzania biosurfaktantów jako czynnika stymulującego procesy bioremediacji zanieczyszczeń węglowodorowych. Ponadto, podjęto się ewaluacji skuteczności immobilizacji mikroorganizmów jako metody zwiększającej tempo procesów bioremediacyjnych.

W swojej pracy doktorskiej mgr inż. Agnieszka Wolniewicz pracowała na mikroorganizmach w formie mieszanej hodowli o potencjale degradacyjnym w stosunku do węglowodorów, izolowanych zgodnie z zasadami poprawnego skriningu z miejsc zanieczyszczonych tymi związkami. Określiła ich potencjał degradacyjny, wyznaczyła optymalne warunki wzrostu oraz określiła wpływ postaci izolatów (zawiesina vs. immobilizat) na ich żywotność w warunkach laboratoryjnych. Doktorantka podjęła się ewaluacji potencjału degradacyjnego wytypowanych mikroorganizmów w warunkach polowych oraz określiła zmiany struktury taksonomicznej mikrobiomu glebowego podczas procesu bioremediacji w warunkach polowych.

W pracy doktorskiej, której dotyczy ta recenzja, bardzo mocno wybrzmiał utylitarny charakter badań. Jak Doktorantka sama zauważyła w dyskusji, temat pracy badawczej, opisany w dysertacji, na pierwszy rzut oka jest mało atrakcyjny naukowo. Jest to tematyka szeroko opisywana w literaturze fachowej od dłuższego czasu i stosunkowo trudno znaleźć w niej punkt zaczepienia dla nowej hipotezy badawczej. Słusznie jednak Autorka zadaje pytanie dlaczego, mając na uwadze powyższe, węglowodory nadal stanowią problem środowiskowy? Tak rozpoczęta dyskusja to szereg ważnych z punktu widzenia hipotezy pracy pytań oraz logiczny wywód, wprowadzający w problem badawczy oraz zaproponowane rozwiązanie praktyczne, z jednoczesną weryfikacją postawionej hipotezy. Doktorantka powołuje się w dyskusji na stosunkowo starą bibliografię, co podkreśla fakt, że temat badawczy nie jest nowy, jednak wykorzystane źródła literaturowe dobrze uzupełniają dyskusję dysertacji. Zdaję sobie sprawę z faktu, że doktorat ten miał mieć bardzo silny wydźwięk praktyczny prowadzonych badań i w moim odczuciu to zadania świetnie spełnił. Z naukowego punktu widzenia brakuje mi jednak głębszego zastanowienia się nad pewnymi zagadnieniami naukowymi, które wydają mi się bardzo ciekawe i mogą stanowić podstawę dalszych badań, zawierających mocny element nowości naukowej. Szczególnie ważne wydaje mi się przyjrzenie się bliżej mechanizmowi działania ramnolipidów na bakterie w glebie w procesie bioaugmentacji (patrz pkt 12 poniżej) oraz głębsza analiza taksonomiczna zmian, jakie zaszły w mikrobiomie gleby ww. trakcie i po procesie

bioremediacji i jej powiązanie z tym procesem (patrz pkt 13 poniżej). Zdaję sobie sprawę, że zadaniem Doktorantki, jak wielokrotnie też podkreśliła, była weryfikacja hipotezy badawczej pod kątem użytkowym i ważnym z punktu widzenia jej wieloletniego doświadczenia zawodowego, redukcji kosztów i zasadności pewnych działań praktycznych. Niemniej jednak praca doktorska jest pracą naukową i zgłębienia ww. zagadnień w aspekcie poznawczym brakowało mi w dyskusji wyników. Poniżej przedstawiam kilka uwag oraz pytań, które mogą stanowić początek dyskusji nad zagadnieniami prezentowanymi w pracy:

1. Jak Doktorantka wyjaśni fakt, że niejednokrotnie konsorcja mikroorganizmów mają większe możliwości metabolizowania i degradacji węglowodorów niż poszczególne pojedyncze szczepy (s. 35)?
2. Węglowodory są bardzo powszechnym typem zanieczyszczeń gleby, dlatego też chciałabym zapytać na jakiej podstawie założono, że gleba kontrolna do doświadczeń nie miała wcześniej kontaktu z takim zanieczyszczeniem (s. 60)? Dlaczego nie podjęto analizy obecności węglowodorów w tej próbce?
3. Na podstawie jakiej metodyki inkubowano bakterie mezo- i psychrofilne odpowiednio w temperaturze 36°C i 15,5°C (s. 65)?
4. W jaki sposób uniknięto rozwarstwiania hodowli płynnej mikroorganizmów z dodatkiem oleju napędowego podczas inkubacji z wytrząsaniem (s. 66, 67)?
5. Na podstawie jakich przesłanek (metodyki) założono, że 10-cio krotne pasażowanie hodowli pozwoli na uzyskanie ustabilizowanego konsorcjum bakteryjnego do dalszych doświadczeń (s. 66)?
6. Jak zapewniono jednorodność próbek gruntu do oznaczeń cytometrycznych (s. 69), zważywszy na fakt, że gleba jest z natury środowiskiem wysoce heterogenicznym?
7. Mam wątpliwość nomenklaturową w kwestii oznaczeń cytometrycznych komórek aktywnych/martwych. Doktorantka używa pojęcia „subpopulacja komórek”. To określenie jest zasadne przy komórkach eukariotycznych, np. w analizie nowotworów, jednak w kwestii mikrobiologicznych hodowli mieszanych (konsorcjów) jakimi są zbiorowiska badane w tej pracy nie możemy mówić o populacji i subpopulacji. Wynika to z faktu, że populacja jest z natury jednogatunkowa, a z przeprowadzonych badań metataksonomicznych wiadomo, że

- zbiorowisko było stosunkowo zróżnicowane taksonomicznie (s. 91 i dalej). To samo tyczy się użycia definicji populacji na stronie 115. Doktorantka obserwowała zmiany w konsorcjum, zbiorowisku lub biocenozie, a nie w populacji. Unikałabym takiego sformułowania w tym kontekście.
8. Z czego zdaniem Doktorantki wynika fakt, że wyizolowane mikroorganizmy składały się w przeważającym stopniu z mikroorganizmów mezofilnych (s.93)?
  9. Na stronie 98 rozprawy doktorskiej Doktorantka wspomina, że uzyskane wyniki dot. kinetyki wzrostu mikroorganizmów z i bez dodatku ramnolipidów można „interpretować jako brak toksycznego oddziaływania ramnolipidów na badane mikroorganizmy”. Dlaczego założono, że ramnolipidy są toksyczne? Czy Doktorantka może wskazać jakieś wyniki badań w tym zakresie?
  10. Czy nie wydaje się oczywistym, że analiza udziału komórek żywych w próbce bezpośrednio po podaniu biopreparatu będzie wskazywać na wzrost liczby tej frakcji mikroorganizmów, zważywszy na fakt, że użyta tu metoda nie przyporządkowuje oznaczonych podgrup bakteryjnych do ich pozycji taksonomicznych (oznaczane są tylko żywe, martwe i o obniżonej aktywności, a więc i te wprowadzone z bioszczepionką, a żadne nie są specyficznie znakowane)?
  11. Doktorantka poczyniła bardzo ciekawe i ważne z punktu widzenia naukowego obserwacje dotyczące istotnej statystycznie korzystnej zmiany aktywności bakterii aktywnych i umiarkowanie aktywnych po dodaniu ramnolipidów, utrzymujące się dodatkowo do końca eksperymentu (s. 111). Doktorantka wyjaśnia to zjawisko lepszą adaptacją mikroorganizmów, bez wpływu na efektywność degradacji związków ropopochodnych (s. 119). Jaki mógłby być mechanizm takiego zjawiska? Czy może się to jakoś łączyć z biodegradowalnością ramnolipidów (s. 126), a co za tym idzie ich rolą jako dodatkowego źródła węgla? Czy Doktorantka przeprowadzała dodatkowe analizy w tym zakresie lub planuje pochylić się nad tym zagadnieniem naukowym?
  12. Nie zgadam się z użyciem w dysertacji pojęcia „analiza metagenomowa” (s. 112). Doktorantka przeprowadziła analizę metataksonomiczną, nie badała całości metagenomu (całej puli genowej zbiorowiska), jedynie analizowała biocenozę z użyciem fragmentu genu kodującego 16S rRNA, co zgodnie z proponowaną nomenklaturą (Marchesi, J.R., Ravel, J.
  - 13.

The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* 3, 31 (2015). <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>) jest analizą metataksonomiczną.

14. Czy tak duży wzrost udziału *Proteobacteria* (głównie *Gammaproteobacteria*) w zbiorowisku wyizolowanym jako konsorcjum hodowalne w laboratorium nie jest właśnie związane bardziej z faktem „hodowalności” tych mikroorganizmów? Doktorantka założyła, że wynika to tylko ze zdolności tych bakterii do rozkładu węglowodorów, a warto zwrócić uwagę, że konsorcja, które wykorzystywane były w eksperymencie były *de facto* hodowalną frakcją bakterii, zdolną do utylizacji związków ropopochodnych (s. 113).
15. Rysunki 36 i 37 przedstawiają strukturę taksonomiczną zbiorowisk badanych, a nie ich bioróżnorodność. W dysertacji nie obliczano/określano poziomu bioróżnorodności zbiorowisk, jedynie analizowano ich strukturę taksonomiczną i na tej podstawie określono czy są „bardziej lub mniej różnorodne”, bez konkretnych wartości liczbowych. Brakuje mi tutaj dodatkowej analizy w zakresie indeksów bioróżnorodności (np. indeksu Shannona, Simpsona etc.) i ich połączenia ze zmianami taksonomicznymi oraz procesem bioremediacji (s. 115, 116).
16. Na rysunku 37 na jasnoczerwono zaznaczono „chloroplast” – czy Doktorantka mogłaby wyjaśnić, czego dotyczy ta nazwa i jakie są wartości liczbowe tej frakcji w stosunku do pozostałych taksonów (np. w tabeli; s. 115)?
17. Doktorantka zwróciła uwagę na ważny aspekt z zakresu ekologii mikroorganizmów w kwestii równowagi ekologicznej. Każda biocenoza, zaburzona czynnikiem zewnętrznym, podejmuje wysiłki w powrocie do równowagi poprzedzające zaburzenie. Dlaczego zdaniem Doktorantki tak się dzieje i czy równowaga po przewyciężeniu tego czynnika (cyt. stan sprzed bioaugmentacji – s. 116) jest dokładnie tym samym stanem konsorcjum taksonomicznie, bioróżnorodnie i funkcjonalnie?
18. Na stronie 125 Doktorantka wraca do tematu zmiany aktywności bakterii wprowadzanych jako bioszczepionka do gleby, co tłumaczy niezgodnością wprowadzanego mikrobiomu z mikroorganizmami autochtonicznymi. Czy w takim razie zdaniem Doktorantki, jako praktyka, nie bardziej zasadnym podejściem byłaby izolacja autochtonicznych mikroorganizmów w celu stworzenia bioszczepionki lub stymulacja autochtonicznej mikroflory *in situ*, zamiast wprowadzania wyselekcjonowanych mikroorganizmów w procesie bioaugmentacji?

19. Wniosek 6 w świetle moich uwag w punktach 8 i 15 powinien brzmieć: wielokrotne pasażowanie konsorcjów na podłożu selekcyjnym prowadzi do zubożenia taksonomicznego zbiorowiska, ale jednocześnie powoduje wzrost udziału w konsorcjach frakcji komórek aktywnych fizjologicznie, co przekłada się na efektywną degradację oleju.

## **2. Ocena zasadności podjętej tematyki badawczej**

Problem naukowy, którego rozwiązania podjęła się w recenzowanej rozprawie Doktorantka, dotyczy opracowania wytycznych umożliwiających pozyskanie i efektywne wykorzystanie biopreparatów mikrobiologicznych do remediacji terenów zanieczyszczonych węglowodorami. Jednocześnie Doktorantka zweryfikowała hipotezę negującą zasadność wprowadzania biosurfaktantów jako czynnika stymulującego procesy bioremediacji zanieczyszczeń węglowodorowych w warunkach długoterminowego eksperymentu polowego i oceniła skuteczność immobilizacji mikroorganizmów jako metody zwiększającej efektywność procesów bioremediacyjnych. Tematyka ta wpisuje się w zagadnienia badań w zakresie inżynierii środowiska oraz szeroko pojętej jego ochrony. Praca doktorska dotyczy procesów bioremediacyjnych gleby, a ten temat jest nadal niezwykle ważny w ww. dyscyplinie naukowej.

Zasadność przyjętej tematyki badawczej oceniam pozytywnie. Doktorantka wykonała szeroko zakrojony eksperyment badawczy, obejmując również niezwykle ważne z punktu widzenia wdrożenia długoterminowy eksperyment polowy. Ponadto, w dysertacji wybrzmiało jej doświadczenie zawodowe oraz znajomość norm i regulacji prawnych w temacie badawczym, co w moim odczuciu jest niezwykle ważnym elementem planowania działań bioremediacyjnych i przygotowywania procedur postępowania. Badania wykonane w ramach tej dysertacji pozwoliły zweryfikować hipotezę badawczą i wyciągnąć wniosek o bezzasadności stosowania ramnolipidów jako substancji zwiększających efektywność biodegradacji związków ropopochodnych w glebie w procesach bioaugmentacji, co jest ważną wskazówką dla praktyków realizujących zadania obejmujące bioremediację gleby.

## **3. Osiągnięcia pracy**

Zanieczyszczenie gleby związkami ropopochodnymi nie tylko w Polsce jest nadal ważnym i nierozwiązanym problemem środowiskowym. Ten typ zanieczyszczeń występuje bardzo powszechnie, a efektywne metody usuwania takich zanieczyszczeń, w szczególności w zakresie

wykorzystania biotechnologii, są tutaj bezcenne. Za osiągnięcie w tej dysertacji uznaję przygotowanie procedury stosowania biopreparatów w remediacji gruntu zanieczyszczonego węglowodorami, zarówno w warunkach *in situ*, jak i *ex situ*, co stanowiło podstawę wdrożeniową tego doktoratu. Przygotowanie ww. procedury w oparciu o prawidłowo zaplanowany i przeprowadzony eksperyment badaczy stanowi niewątpliwy walor przedstawionej do oceny pracy.

#### 4. Podsumowanie pracy

Doktorantka przedstawiła do oceny doktorat o charakterze praktycznym, będącą wynikiem badań laboratoryjnych, poprzedzonych wstępem teoretycznym, stanowiącym dobrze zarysowane tło problemu badawczego i charakterystykę materiału badawczego. Badania zostały przeprowadzone w sposób kompleksowy, a ich wymiernym efektem jest przygotowanie procedury stosowania biopreparatów w remediacji gruntu zanieczyszczonego węglowodorami. W pracy Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów językowych, interpunkcyjnych i edycyjnych, które z reguły są nieuniknione i w żaden sposób nie umniejszają merytorycznie przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej. W moim odczuciu część dyskusyjna, jako tekst techniczny, powinna być pisana bezosobowo, jednak nie zmienia to faktu, że czyta się tę część dobrze i stanowi ona logiczny i płynny wywód, oparty na uzyskanych wynikach.

W oparciu o przeprowadzone badania Doktorantka sformułowała 10 wniosków, które pozwoliły zweryfikować postawione na początku pracy hipotezy badawcze. Moim zdaniem najważniejsze z nich to:

Wniosek 5: Optymalne parametry wzrostu konsorcjów w warunkach laboratoryjnych sprowadzają się do temperatur w zakresie 20-30°C, odczynu pH zbliżonego do obojętnego oraz stosunku węgla do azotu wynoszącego 20:1.

Wniosek 7: Unieruchamianie analizowanych konsorcjów degradujących węglowodory w alginianie sodu lub nośnikach mineralnych spowodowało istotny spadek żywotności mikroorganizmów, co dyskwalifikowało te techniki jako sposób bioaugmentacji.

Wniosek 9: Długoterminowe doświadczenie polowe dotyczące biodegradacji węglowodorów w zanieczyszczonym gruncie przez użycie konsorcjum (P1) potwierdziło zdolność tych mikroorganizmów do zasiedlenia skażonego środowiska i jego skutecznej bioremediacji. Podczas eksperymentu trwającego 356 dni uzyskano 89% redukcji węglowodorów z początkowego stężenia wynoszącego 6630 mg/kg s.m.



Wniosek 10: W odniesieniu do biosurfaktantów uzyskane wyniki pozwoliły na potwierdzenie przyjętej hipotezy badawczej opierającej się na podważeniu roli tego typu związków jako czynnika zwiększającego degradację węglowodorów podczas procesów bioremediacyjnych. Prowadzone badania laboratoryjne z suplementacją ramnolipidami w stężeniach 50-250 mg/l nie wpłynęły na parametry wzrostu konsorcjów. Hipotezę badawczą potwierdzono także badaniami polowymi, w których poddano remediacji grunt zanieczyszczony olejem napędowym. Wprowadzenie do zanieczyszczonego gruntu ramnolipidów zwiększało udział subpopulacji komórek aktywnych w konsorcjum P1, jednak żaden sposób nie przekładało się to na zwiększenie tempa procesów degradacyjnych.

## 5. Konkluzja końcowa

Przedstawiona do oceny dysertacja potwierdza umiejętności Doktorantki w planowaniu i samodzielnej realizacji badań naukowych, analizowaniu i dyskutowaniu uzyskanych wyników oraz poprawnym wyciąganiu wniosków. W moim odczuciu rozprawa doktorska jest merytoryczna, spójna tematycznie i posiada bardzo mocno podkreślony charakter aplikacyjny wykonanych badań w zakresie inżynierii środowiska. Nie mam wątpliwości, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Agnieszki Wolniewicz pt. Analiza czynników determinujących efektywność degradacyjną biopreparatów mikrobiologicznych wykorzystywanych w remediacji środowiska zanieczyszczonego węglowodorami, 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 (tekst jedn. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789), zgodnie z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669). Wnoszę więc o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim na Wydziale Inżynierii Środowiska i Inżynierii Mechanicznej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu w dyscyplinie inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka.

A. Kiełbaso - Buzyl



