Prof. dr hab. inż. Jan Hupka
Katedra Inżynierii Procesowej
i Technologii Chemicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska

Gdańsk, 31.12.2019

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Agaty Joanny Zdarta
pt. *Wpływ zanieczyszczeń węglowodorowych na zdolności adaptacyjne mikroorganizmów do biodegradacji związków alifatycznych i aromatycznych*
(promotor: dr hab. inż. Ewa Kaczorek)

Praca doktorska mgr inż. Agaty Zdarta powstała w zespole naukowym profesor Ewy Kaczorek i jest kolejną z szeregu dysertacji w tematyce aspektów ekologicznych chemii organicznej i przemysłowej, ukierunkowanych na wykorzystanie wyselekcjonowanych mikroorganizmów do usuwania zanieczyszczeń środowiskowych, tj. bioaugmentacji. Doktorantka nawiązuje do biodegradacji węglowodorów o różnej rozpuszczalności lub rozproszeniu w fazie wodnej (aromatycznych, alifatycznych i oleju napędowego) w obecności wyizolowanych ze środowiska komórek mikroorganizmów ze szczepów *Raoultella planticola* M01, *Raoultella ornithinolytica* M03 *oraz Acinetobacter calcoaceticus* M1B.

Usuwanie pochodnych ropy naftowej ze środowiska wymaga poszerzenia wiedzy w temacie dysertacji, tj. możliwości uogólnień na podstawie eksperymentów i obserwacji zmian właściwości powierzchniowych i zdolności biodegradacyjnych komórek mikroorganizmów wyizolowanych ze środowiska naturalnego. Podjęta w dysertacji tematyka wpisuje się w nurt współczesnych trendów chemicznych i technologicznych i jest ważna z punktu widzenia gospodarczego i ekologicznego, a zarazem wymaga badań nad chemizmem i aspektami środowiskowymi. W tym odniesieniu, praca badawcza i dysertacja mgr inż. Agaty Zdarta są uzasadnione i potrzebne pod względem naukowym i aplikacyjnym.

Praca doktorska mgr inż. Agaty Zdarta wykonana na Wydziale Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej obejmuje 173 strony, zawiera 32 rysunki, 18 tabel, 209 pozycji literaturowych. Niemal 13% cytowanych artykułów zostało opublikowanych w latach 2017-2019, co świadczy o zgłębianiu literatury przedmiotu na bieżąco. Rozprawa podzielona została na trzy części: literaturową - zawierającą trzy rozdziały, eksperymentalną - zawierającą 8 rozdziałów oraz rozbudowaną część z wynikami badań i dyskusją wyników. Odrębne, nienumerowane rozdziały stanowią: spis skrótów i symboli, wprowadzenie, cel i zakres pracy oraz podsumowanie. Rozprawę zamyka wykaz cytowanej literatury, spis tabel i rysunków, dorobek naukowy Autorki, streszczenie w języku polskim i w języku angielskim oraz aneks w postaci plików elektronicznych, zawierających suplementarny materiał biochemiczny.

Po zwięzłym *Wprowadzeniu*, następuje omówienie literatury przedmiotu, zawarte w trzech rozdziałach. Doktorantka wykazała się tutaj wysoką znajomością przedmiotu dysertacji odnośnie zachowania się i charakterystyki chemicznej zanieczyszczeń węglowodorowych w środowisku, wymogów legislacyjnych, sposobów usuwania zanieczyszczeń i znaczenia w nich mikroorganizmów, a przede wszystkim znajomością charakterystyki mikroorganizmów, wyczerpująco przybliżając ich budowę i właściwości, uwarunkowania biologiczne efektywnego transportu i metabolizmu zanieczyszczeń oraz znaczenia bioaugmentacji w oczyszczaniu środowiska. Kompetencje Doktorantki w przedmiocie dysertacji są wyraźnie widoczne w omówieniu wpływu wybranych węglowodorów na zdolności degradacyjne wybranych szczepów bakterii, w tym na stres metaboliczny i odpowiedź komórkową, ścieżki

degradacji oraz modyfikację właściwości komórek - tematach, w których Doktorantka obraca się bardzo swobodnie.

Zbytniej rozbudowie części literaturowej zapobiegły przejrzyste i merytorycznie poprawne zestawienia tabelaryczne: tabela 1.2. (przykłady wykorzystania bioaugmentacji do zanieczyszczeń węglowodorowych) oraz tabela 1.3. (zmiany wybranych właściwości mikroorganizmów pod wpływem kontaktu z węglowodorami). Skoncentrowanie się na biodostępności zanieczyszczeń węglowodorowych, a zarazem docenienie znaczeniu fizykochemii powierzchni w badaniach zmiany morfologii powierzchni komórek, kluczowego czynnika przebiegu procesu biodegradacji, potwierdza niewątpliwe predyspozycje naukowe Doktorantki. Oto kilka uwag szczegółowych, odnoszących się do części literaturowej:

- Jednoznaczne stwierdzenie: *Parametry przedstawione na Rysunku I. 3 są kluczowymi przy doborze optymalnej metody usuwania zanieczyszczeń węglowodorowych* nie ma oparcia w omówieniu literatury (rozdz. 1.3.).
- Wskazując na: *...obecność mikroorganizmów (między innymi bakterii lub grzybów), zdolnych do pobierania związków ropopochodnych i przekształcania ich na drodze przemian metabolicznych...* warto było wspomnieć o naturalnym uwalnianiu węglowodorów do środowiska, z czego tylko ilość ropy naftowej wyciekającej globalnie do wód morskich jest szacowana na 400 tys. ton rocznie. Długi okres zanieczyszczania środowiska węglowodorami z naturalnych źródeł pozwolił na adaptację mikroorganizmów, co bardzo przemawia za korzystaniem z mikrobiologicznych metod oczyszczania środowiska z węglowodorów.
- Już ponad pół wieku temu wskazywano w artykułach i zastrzegano w patentach, preparaty związków azotu i fosforu, wykazujące wysoką adhezję do plam olejowych, jako czynnik limitujący szybkość degradacji węglowodorów na morzu i akwenach śródlądowych.
- Może warto było zilustrować wzrost i namnażanie się bakterii odpowiednio skomentowanym wykresem krzywej wzrostu bakterii (rozdz. 2.2.)?
- Napotyka się nie do końca przemyślane cytowania, jak np. ostatnie zdanie na str. 22: *...dokładny mechanizm oddziaływania zanieczyszczeń hydrofobowych na membrany biologiczne nie został jeszcze do końca przebadany i wymaga zaawansowanych badań [46]* - gdyż fenole nie są najlepszym przykładem zanieczyszczeń hydrofobowych, a publikacja pochodzi z 2008 roku.
- Wywód nt. wpływu adhezji i zjawisk elektrokinetycznych na biodostępność zanieczyszczeń w rozdz. 2.2. jest bardzo zwięzły, stąd proszę o uwzględnienie tego tematu w prezentacji na obronie (roztwór glebowy, zwilżanie, micelle, hydrofobowość powierzchni komórek, forma występowania zanieczyszczeń).

Podsumowanie omówienia literatury przedmiotu zamieszczono na początku rozdziału *Cel i zakres pracy*, akcentując niedostateczną wiedzę w obszarze mechanizmów przemian zachodzących w komórkach eksponowanych na szkodliwe działanie ksenobiotyków. Celem badań było określenie:

- wpływu mieszaniny wybranych węglowodorów aromatycznych i alifatycznych na modyfikację komórek podczas adaptacji mikroorganizmów do biodegradacji w warunkach tlenowych,
- zdolności degradacyjnych mikroorganizmów względem oleju napędowego z wykorzystaniem szczepów bakteryjnych, wyizolowanych z próbek środowiskowych, oraz konsorcjum mikroorganizmów autochtonicznych zawartych w wodzie jeziornej.

Stosownie do powyższego mgr inż. Agata Zdarta sformułowała cztery zadania badawcze.

Eksperymentalna część dysertacji stanowi obszerny i szczegółowy opis metodyk badawczych i analitycznych. Rozpoczyna się od opisu odczynników i aparatury, przygotowania szkła i roztworów do badań. Ważny rozdział stanowi opis izolacji i charakterystyka szczepów bakteryjnych. W dalszej części opisano proces izolacji i charakterystykę mikroorganizmów pozyskanych z próbek środowiskowych oraz metodykę określenia wpływu zanieczyszczeń węglowodorowych na komórki wyizolowanych szczepów. W pięciu ostatnich rozdziałach omówiono właściwości powierzchniowe komórek, analizę zmian właściwości komórek eksponowanych na węglowodory aromatyczne, analizę metagenomową oraz wskazano metodykę statystycznej oceny wyników badań. Wielowątkowy opis metodyk pomiarowych i korzystanie z nowoczesnej aparatury we współpracy z innymi ośrodkami badawczymi w Polsce świadczy o dużym zaangażowaniu i posiadaniu solidnych i aktualnych umiejętności laboratoryjnych przez Doktorantkę.

W trzeciej części pracy zamieszczono i omówiono wyniki badań, które odnoszą się do izolacji i selekcji mikroorganizmów (dla każdego z badanych szczepów wykonano drzewo podobieństwa filogenetycznego, a sekwencje zidentyfikowanych mikroorganizmów zostały zgłoszone do bazy GenBank, National Center for Biotechnology Information), ekspozycji na węglowodory i jej wpływ na właściwości komórek, analizy zmian właściwości komórek eksponowanych na węglowodory aromatyczne (wskazują na znaczące różnice w poziomie ekspresji białek w komórkach szczepów w porównaniu do prób nieeksponowanych), porównanie zmian właściwości biodegradacyjnych komórek eksponowanych i nieeksponowanych na węglowodory (przemawiająca jest tutaj dokumentacja fotograficzna), oraz wykorzystania uzyskanych szczepów do oczyszczania zaolejonej wody (bardzo przejrzysta jest tabela IV 1. z wynikami badania efektywności biodegradacji węglowodorów i charakterystyką komórek szczepów).

Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują, że komórki poddane ekspozycji na zanieczyszczenia węglowodorowe podejmują najczęściej modyfikacje, polegające na zwiększeniu hydrofobowości powierzchni oraz na znaczących zmianach przepuszczalności i płynności błony komórkowej, w wyniku zmian udziału nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych. Przeprowadzone analizy proteomiczne wykazały istotne modyfikacje profili białkowych komórek, w szczególności aktywności peptydów zaangażowanych w procesy syntezy białek. Zaobserwowano również, że *szybka* odpowiedź komórek charakteryzuje się większą intensywnością i modyfikacjami poziomów akumulacji innych białek komórkowych niż odpowiedź *długoterminowa* (w wyniku długotrwałej ekspozycji na węglowodory).

Wyizolowane z próbek gleby bakterie o potwierdzonych zdolnościach degradacyjnych w stosunku do węglowodorów wchodzących w skład oleju napędowego zwiększały swoje zdolności remediacyjne w wyniku ekspozycji na węglowodory. Podobne zmiany zaobserwowano również w przypadku komórek mikroorganizmów poddanych ekspozycji na naturalne związki powierzchniowo-czynne. Są to ważne obserwacje z punktu widzenia technologii oczyszczania środowiska, pozwalające na zaoszczędzenie znaczących ilości surfaktantów, wspomagających proces biodegradacji zanieczyszczeń węglowodorowych.

Przedstawione w dysertacji wyniki analiz puli DNA bakterii wyizolowanych ze zbiorników słodkowodnych sugerują duże zróżnicowanie możliwości dostosowawczych mikroorganizmów z różnych środowisk do degradacji oleju napędowego. Niemniej jednak, należy podkreślić zaobserwowany korzystny wpływ bioaugmentacji na bioróżnorodność bakterii zajmujących dany habitat w przypadku zanieczyszczenia go węglowodorami ropopochodnymi.

Na wyróżnienie zasługuje merytoryczna dyskusja wyników, kończąca każdy rozdział. Szkoda, że nie podkreślono w tym miejscu, czy i gdzie wyniki badań zostały opublikowane. Trzy własne artykuły cytowane są tylko w części omawiającej literaturę przedmiotu.

Doktorantka wykonała ogrom pracy systematycznie identyfikując mikroorganizmy i charakteryzując produkty degradacji węglowodorów. Klarowne i jednoznaczne wnioski - ze wskazaniem nowości naukowej - korespondują z postawionymi zadaniami badawczymi.

Najważniejsze osiągnięcia naukowe będące wynikiem prowadzonych badań i opublikowane w renomowanych czasopismach - patrz pozycje 8, 11, 14 i 15 w wykazie dorobku naukowego (strona 163) mgr inż. Agaty Zdarta, która jest pierwszym autorem - to:

- Wykazanie możliwości indukcji zmian właściwości powierzchniowych komórek w wyniku ekspozycji na zanieczyszczenia węglowodorowe oraz zbadanie wielopoziomowych zmian właściwości komórkowych zachodzących pod wpływem ekspozycji na zanieczyszczenia węglowodorowe, co pozwoli lepiej zrozumieć procesy ich biologicznej degradacji.
- Zaproponowanie nowych rozwiązań technologicznych w bioremediacji gruntów zanieczyszczonych węglowodorami poprzez wykorzystanie komórek poddanych wcześniejszej ekspozycji na węglowodory lub namnożonych w hodowlach z dodatkiem naturalnych surfaktantów.

Oto dalsze uwagi szczegółowe, odnoszące się do części eksperymentalnej:

- Czy surfaktanty powstające w wyniku degradacji węglowodorów zwiększą zdolności remediacyjne w układzie glebowym?
- Czy zaobserwowana mniejsza efektywność biodegradacji ON może wynikać ze zmiennych udziałów dodatków uszlachetniających paliwo, utrudniających adaptację mikroorganizmów? Wg karty charakterystyki ON stanowi *mieszanina węglowodorów C9-C25 pochodzenia naftowego (olej napędowy) oraz estrów metylowych wyższych kwasów tłuszczowych np.* $C_{17}H_{33}COOCH_3$, *zawierająca dodatki uszlachetniające: detergenty, dodatki smarnościowe, przeciwkorozyjne, poprawiające odporność na utlenianie, podwyższające liczbę cetanową, deemulgujące i depresatory; może zawierać dodatki przeciwpienne, biobójcze oraz znacznik paliwa (max 3 000 ppm).* Trudno dla takiego substratu otrzymać jednoznaczne wyniki biodegradacji. Zdecydowanie łatwiejsza do interpretacji wyników jest mieszanina modelowa.
- Na wykresach ruchliwości elektroforetycznej powinna być podana temperatura, pH i siła jonowa fazy wodnej - te możliwości pomiarowe daje zastosowany zetametr. Parametry te powinny też być uwzględnione w interpretacji wyników badań.

Dysertacji nadano staranną szatę graficzną, niemniej zauważyłem niezręczne terminy techniczne i naukowe oraz bardzo liczne błędy maszynowe.

Wartym podkreślenia jest realizacja wybranych badań zamieszczonych w dysertacji w ramach kilku grantów, a przede wszystkim w ramach projektu NCN Preludium 10 - środki przyznano Doktorantce w 2016 roku jako kierownikowi grantu. Imponujący jest też ogólny dorobek publikacyjny Doktorantki jako współautora, i członka zespołów realizujących kilka grantów, obejmujący 21 artykułów o sumarycznym czynniku wpływu 54, oraz doniesienia konferencyjne.

Podsumowanie

Obszarem badawczym mgr inż. Agaty Zdarta był wpływ wybranych węglowodorów aromatycznych i alifatycznych na właściwości i funkcjonowanie komórek bakterii zdolnych do ich biodegradacji. Część literaturowa stanowi starannie opracowane, zwięzłe kompendium wiedzy na temat usuwania zanieczyszczeń węglowodorowych oraz wykorzystania w tym celu mikroorganizmów z oceną wpływu węglowodorów alifatycznych i aromatycznych na komórki. Wraz z wynikami badań w tym zakresie uzyskano znaczące wzbogacenie wiedzy o

właściwościach mikroorganizmów degradujących węglowodory oraz możliwości indukowania przemian komórkowych, w celu zwiększenia efektywności biodegradacji związków aromatycznych i alifatycznych.

Na podstawie starannie zaplanowanych i przeprowadzonych badań Doktorantka określiła wpływ zaproponowanych substancji na komórki, oceniła możliwości indukcji wybranych zmian właściwości komórkowych oraz przeanalizowała możliwości poprawy zdolności biodegradacyjnych badanych mikroorganizmów a zarazem dokonała wyczerpującej i oryginalnej dyskusji uzyskanych wyników. Tym samym mgr inż. Agata Zdarta zrealizowała postawione sobie cele pracy oraz wykazała się umiejętnością prowadzenia samodzielnych badań naukowych.

Uzyskane wyniki potwierdzają znaczące modyfikacje hydrofobowości powierzchni komórek, potencjału elektrokinetycznego i przepuszczalności błony komórkowej, jak również wskazują na zmiany w profilu kwasów tłuszczowych i białek oraz aktywności genetycznej i enzymatycznej badanych bakterii, co stanowi istotny wkład poznawczy i technologiczny w rekultywację gleb i środowiska wodnego i uzasadnia podjęcie tematyki zaprezentowanej w dysertacji. Należy podkreślić, że pozytywny wpływ ekspozycji komórek na związki węglowodorowe stanowi obiecujący materiał do dalszych badań nad indukcją zmian w komórkach mikroorganizmów, a opracowane i zaprezentowane w ramach przedkładanej rozprawy doktorskiej wyniki pozwoliły lepiej zrozumieć mechanizmy rządzące procesem adaptacji komórek do biodegradacji węglowodorów. Chcę podkreślić interdyscyplinarne podejście do rozwiązania problemu z pogranicza biochemii, mikrobiologii, biotechnologii oraz technologii ochrony środowiska, a zarazem uwzględnienie fizykochemii powierzchni oddziaływań mikroorganizmów z zanieczyszczeniami na poziomie komórkowym i molekularnym, w tym badania aplikacyjności wybranych bakterii do usuwania zanieczyszczeń węglowodorowych.

W tym odniesieniu, uznaję dysertację mgr inż. Agaty Zdarta za dojrzałą pracę naukową, która wnosi nowe wartości do podstaw chemicznych i biochemicznych technologii likwidacji zanieczyszczeń środowiska. Przedstawione w pracy badania są metodologicznie poprawne, a uzyskane wyniki, które poddano analizie statystycznej, są ważne zarówno z naukowego, jak i praktycznego punktu widzenia. Zasygnalizowane w recenzji uwagi krytyczne mają przede wszystkim charakter dyskusyjny i nie umniejszają wartości naukowej i praktycznej dysertacji.

Dysertacja mgr inż. Agaty Joanny Zdarta spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym. W tym odniesieniu stawiam wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne, Wydział Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej, o **dopuszczenie** mgr inż. Agaty Zdarta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kluczowe wyniki, stanowiące odniesienie do celu i zakresu pracy, zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych o międzynarodowym zasięgu a sama praca stanowi kompendium wiedzy o wysokich walorach poznawczych i praktycznych, dlatego proponuję **wyróżnienie** ocenianej dysertacji.