



Gliwice, dnia 10/10/2021

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Piotra Drożdżyńskiego
„Biosurfaktanty otrzymywane z endofitycznych bakterii
wyizolowanych z *Chelidonium majus* L. – produkcja i zastosowanie”

1. Formalne podstawy wykonania recenzji

Recenzję wykonano na zlecenie Pani dr hab. inż. Anny Diowkszej, Dziekan Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej z dnia 3.08.2021. Podstawą recenzji jest otrzymana rozprawa doktorska w wersji wydrukowanej.

2. Zasadność podjętej tematyki

Spośród związków powierzchniowo czynnych (surfaktantów) wykorzystywanych w wielu gałęziach przemysłu, ostatnimi laty szczególną uwagę przywiązuje się do takich, które pozyskuje się na drodze biologicznej. Biosurfaktanty wykazują wiele korzystnych cech, których nie posiada wiele surfaktantów syntetycznych np. niska toksyczność, znaczna biodegradowalność, nie kumulują się w środowisku przyrodniczym. Z wymienionych powodów są one szczególnie pożądane w ochronie środowiska do likwidacji uciążliwych zanieczyszczeń np. substancji ropopochodnych. Te ostatnie są szczególnie trudne do usunięcia z gleby, gdyż powodują zlepianie grudek ziemi i jej zbrylanie, co znacznie utrudnia ich eliminację.

Do oczyszczania gleb wykorzystuje się różne metody fizyczne, chemiczne i biologiczne. Te pierwsze są wprawdzie szybkie i radykalne, ale kosztowne i stwarzają dodatkowe problemy, natomiast mankamentem metod biologicznych jest ich długotrwałość i często niemożność całkowitego usunięcia zanieczyszczenia. Zanieczyszczenia te najczęściej występują w środowisku jako mieszanina związków o bardzo zróżnicowanej biodegradowalności lub są nawet związkami refrakcyjnymi, czyli w praktyce biologicznie nierozkładalnymi. Stosowanie technologii hybrydowych, łączących procesy fizyczne, chemiczne i biologiczne, jest często skuteczne w warunkach laboratoryjnych, ale w skali technicznej występują trudności ze stabilnością procesu. Dlatego bardzo zasadnym jest poszukiwanie aktywnych mikroorganizmów do bioremediacji gleb na terenach poddanych antropopresji, gdyż można oczekiwać, że tam znajdować się będą drobnoustroje o pożądanych właściwościach. Doktorant uznał, że dobrym inokulum do tego celu będą mikroorganizmy zasiedlające wnętrza roślin z zanieczyszczonych gruntów. Tym sposobem Doktorant zamierzał pokonać jedno z zasadniczych ograniczeń technologii bioremediacji, warunkującym efektywność oraz szybkość tego procesu, a mianowicie dostępność zanieczyszczenia węglowodorowego dla mikroorganizmów prowadzących proces oczyszczania.

Długotrwała obecność węglowodorów w glebie skutkuje ich wiązaniem z organicznymi cząsteczkami matrycy glebowej, czyniąc je niedostępnymi dla mikroorganizmów, tym samym zmniejszając efektywność samooczyszczania się środowiska. Problem ten można rozwiązać stosując nieszkodliwe dla środowiska związki powierzchniowo

czynne pochodzenia mikrobiologicznego. Zanieczyszczenia hydrofobowe w obecności biosurfaktantów zostają zamknięte wewnątrz miceli surfaktantów, co ułatwia ich przenoszenie z matrycy glebowej do fazy wodnej, a tym samym zwiększenia biodostępności węglowodorów dla drobnoustrojów.

Innowacyjnym celem Doktoranta było wykorzystanie potencjału bakterii endofitycznych wyizolowanych z roślin synantropijnych do biosyntezy biosurfaktantów oraz degradacji zanieczyszczeń węglowodorowych. Jest to zamiar ambitny, będący dobrym tematem pracy doktorskiej.

3. Charakterystyka i uwagi do pracy

Praca posiada układ typowy dla prac eksperymentalnych. Po spisie treści i wykazie skrótów, pojawia się polskie i angielskie streszczenie. We wstępie przedstawione zostały powody podjętej tematyki doktoratu oraz zamiary jakie Autor zamierzał zrealizować. W części literaturowej omówione zostały zasadnicze zagadnienia związane z tematyką pracy - mikroorganizmy endofityczne, związki powierzchniowo czynne, węglowodory i ich wpływ na środowisko oraz usuwanie. Do tej części mam kilka uwag.

Przegląd literatury powinien mieć charakter krytyczny, czyli przedstawić aktualny stan wiedzy z zakresu podjętej tematyki, ale także komentarz i uwagi polemiczne do tych publikacji, aby z nich wyłonił się powód podjęcia tematyki przez Doktoranta. Dlatego bez uszczerbku dla pracy można było w przeglądzie literatury pominąć punkt dotyczący węglowodorów – ich charakterystykę, właściwości chemiczne i fizyczne, źródła węglowodorów, skupiając się jedynie na ich wpływie na środowisko i usuwania z niego.

Zawarty w pracy podział drobnoustrojów endofitycznych jest niejednoznaczny (strona 24). Z podanego podziału na endofity fakultatywne, obligatoryjne, „passanger” i oportunistyczne, uwzględniając ich strategie życiowe widać, że fakultatywne endofity mogą być również „passanger” i odwrotnie.

Autor podaje (str.27), że „Sevilla i współpracownicy (2001) dowiedli, że w czasie 24 godzin trzcina cukrowa inokulowana diazotrofem *G. diazotrophicus* Pal5 uzyskała 0,6% całkowitego azotu z biologicznego wiązania azotu. Badania Elbeltagy i współpracowników (2001) donoszą, że ta sama roślina inokulowana wspomnianym szczepem B501 osiągnęła wartość uzyskanego azotu 0,14%, co świadczy o znaczącej ilości azotu przyswojonej przez rośliny.” Czy rzeczywiście 0,14% całkowitego przyswojonego azotu to wartość znaczna?

W punkcie 3.Cel pracy, Autor precyzyjnie podał zarówno cel główny, jak również etapy pracy których realizacja dowieść miała trafności zamiaru wykorzystania biosurfaktanta pozyskiwanego z endofitycznego mikroorganizmu w ochronie środowiska i przemyśle spożywczym.

W kolejnym rozdziale „Materiały i metody” szczegółowo opisane zostały odczynniki i aparatura oraz procedury poszczególnych oznaczeń i eksperymentów. Mam jednak wątpliwość, co do tego czy, jak podaje Autor, zamieszczono w pracy informacje to „szczegółowe dane techniczne” (str.74-76) substratów węglowodorowych. Dla oleju krezotowego (tab.9) podano bowiem zaledwie ich kilka cech fizycznych, a skład chemiczny to podana procentowa maksymalna zawartość wody (1%), fenole ekstrahowane wodą (max. %) oraz składniki rozpuszczalne w toluenie (max. 0,4%). Jeszcze mniej danych podano dla smaru BECHEM (tab.10), gdzie chemiczny jego opis zawiera się w zdaniu, że jest to mieszanina olejów syntetycznych. Jedynie w charakterystyce oleju napędowego zamieszczono nieco więcej informacji o jego chemicznym składzie (bez ilościowych danych), ale już dla wykorzystanego oleju silnikowego nie podano jakichkolwiek jego fizycznych i chemicznych właściwości. Poza tym nawet te lakoniczne informacje są nieporównywalne np. w tabelach 9 i 10 żaden parametr nie jest ten sam. Domyślam się, że dostawca/producent substratów węglowodorowych nie podawał bliższych charakterystyk chemicznych ich składu, ale nie sądzę, aby nie wyznaczył je Autor. Takie dane były potrzebne chociażby przy

określaniu ubytku węglowodorów w procesach bioremediacji, więc zebranie tych danych i sporządzenie tabeli z danymi wszystkich badanych substratów było łatwe do wykonania. Jest to o tyle istotne, że pozwoliłoby przybliżyć odpowiedź na pytanie, które ze składników badanych węglowodorowych decydowały o efektywności usuwania zanieczyszczeń. Autor sam kilkakrotnie słusznie podkreślał, że skład zanieczyszczeń ma wyraźny wpływ na sumaryczny efekt bioremediacji, ale także na rozwój wykorzystywanych roślin.

Inna uwaga dotyczy oznaczania aktywności dehydrogenaz. Aby oznaczenie dawało wiarygodne wyniki ważne jest wyznaczenie optymalnego stężenia TTC w analizowanej próbce. Tym bardziej, że w stosowanej metodyce oznaczeń przyjęto stężenie wyznaczone do oznaczania aktywności dehydrogenaz dla *Aspergillus Niger*, a nie szczepu stosowanego przez Doktoranta.

Punkt „5 Wyniki” jest obszerny i dobrze opracowany. Autor wystrzega się na ogół interpretacji wyników, zasadnie czyniąc to dopiero w następnym rozdziale pracy (6. Omówienie i dyskusja wyników). Mam natomiast uwagi do kilku fragmentów pracy. Rysunek 37 (str. 178) uwidacznia, że zaskakująco najwyższy ubytek węglowodorów obserwowano w próbce z samym dodatkiem biosurfaktanta, gdyż wykres koloru różowego (K+BS) był najniższy. Czy tak było na pewno i nie jest to pomyłka wynikająca ze złej kolorystyki wykresów poszczególnych próbek? Na kolejnym rysunku 38, występuje inna kolorystyka do tych samych próbek i różowa jest próbka kontrolna mająca najwyższy pik (czyli zgodnie z oczekiwaniami).

Autor kilkakrotnie wymienia innowacyjne elementy swojej pracy np. izolacja mikroorganizmów endofitycznych z jaskółczego ziela i ich potencjał biotechnologiczny były tematem niewielu doniesień literaturowych, ale żadne z tych badań nie obejmowały potencjału degradacyjnego ani produkcji związków powierzchniowo-czynnych przez wyizolowane drobnoustroje endofityczne z jaskółczego ziela. Natomiast w ramach pracy przeprowadzono skrining izolatów endofitycznych wyznaczając ich potencjał degradacyjny. Wyizolowane szczepy bakteryjne wykazywały wysoką aktywność degradacyjną, natomiast zaskakująco niska była ta aktywność dla grzybów. Kolejnym krokiem badań była optymalizacja procesu produkcji biosurfaktantów. Do tego celu wykorzystano metodę Taguchi. Biorąc pod uwagę współczynnik udziału każdego wytypowanego czynnika stwierdzono, że największy wpływ na produkcję biosurfaktantów ma źródło węgla (42,03%) i azotu (41,30%). Szkoda, że nie uwzględniono wilgotność jako czynnik w optymalizacji; wprawdzie wpływ wilgotności jest oczywisty, ale dobrze byłoby wyznaczyć ten wpływ ilościowo.

Analiza próbek biosurfaktanta produkowanego przez endofityczny szczep *Bacillus pumilus* wykazała, że ugrupowanie lipidowe biosurfaktanta składa się z estru metylowego kwasu 9,12-oktadekadienowego (linolowego), natomiast hydrofilowa część biosurfaktanta jest trójcukrową strukturą glikolipidową składającą się z D-glukozy, D-arabinozy i D-ksylozy, co potwierdza przynależność endofitycznych związków powierzchniowo czynnych do grupy glikolipidów. Pomimo faktu, że większość bakterii z rodzaju *Bacillus* produkuje lipopeptydy, a niektóre doniesienia literaturowe potwierdzają syntezę glikolipidów przez te bakterie, to jednak w doktoracie po raz pierwszy opisano pozyskiwanie glikolipidowych biosurfaktantów z endofitycznej bakterii z rodzaju *Bacillus*.

Pomimo tego, iż przebieg zmian aktywności dehydrogenaz wykazywał bardzo zróżnicowany charakter, to Autor bardzo umiejętnie i przekonująco dokonał analizę tych zmian. Wysoka aktywność dehydrogenaz glebowych charakteryzowała początek większości eksperymentów bioremediacyjnych niezależnie od użytej mieszaniny węglowodorów, z wyjątkiem oleju kreatorowego. Wysoka aktywność dehydrogenaz glebowych sugeruje obecność łatwo przyswajalnego źródła węgla i intensywnych procesach biooksydacji. Po wyczerpaniu się łatwo dostępnego źródła węgla następuje faza adaptacyjna metabolizmu drobnoustrojowego do degradacji kolejnych frakcji węglowodorowych. Dodatek biosurfaktantów w celu wspomaganie biodegradacji skutkowało redukcją wielkości pików

falowego charakteru zmian aktywności dehydrogenaz glebowych. Zdaniem Doktoranta glikolipid zwiększał biodostępność zanieczyszczenia obecnego w glebie, co powodowało dłużej utrzymującą się na wysokim poziomie aktywność dehydrogenaz glebowych, przez co szybciej osiągnięto rozkład zanieczyszczeń. Najsilniejsze działanie glikolipidu produkowanego przez szczep 2A na degradację zanieczyszczeń zaobserwowano w przypadku zastosowania najtrudniej biodegradowalnego oleju kreozytowego, składającego się głównie z węglowodorów poliaromatycznych. Dodatek glikolipidów pozwolił na znacznie szybszy przebieg procesu oczyszczania zarówno w próbie inokulowanej, jak i próbie z mikroflorą autochtoniczną. W próbie zawierającej tylko mikroflorę autochtoniczną zaobserwowano mniejsze wahania aktywności enzymatycznej, a w końcowym etapie badań aktywność wzrosła, co sugerowało dalszą degradację składników (rys. 20, 21, 41, 42). Wyniki te potwierdzają zdolność środowiska przyrodniczego do prowadzenia powolnego procesu samooczyszczania, który może zostać przyspieszony za pomocą dodatku biosurfaktanta. Jednocześnie Autor przestrzega, że proces bioremediacji wspomaganey dodatkiem biosurfaktantu jest złożony i ten sam czynnik może spowodować odwrotny skutek. Przykładowo, w przypadku zbyt dużej dawki biosurfaktanta ten łatwo przyswajalny związek może spowodować zmniejszenie szybkości wykorzystania trudno rozkładalnego zanieczyszczenia.

Podane przez Autora wnioski potwierdzają zrealizowanie wszystkich etapów zamierzonych badań, a także osiągnięcie głównego celu pracy. Natomiast wymienione w podsumowaniu najważniejsze osiągnięcia pracy doktorskiej są zasadne, posiadają innowacyjne walory oraz stanowią cenny wkład w rozwój biotechnologii środowiskowej oraz biogospodarki obiegu zamkniętego.

Spośród wielu osiągnięć Doktoranta wymienionych we wnioskach i podsumowaniu, moim zdaniem na szczególne wyróżnienie zasługuje:

1. Udowodnienie, że bakteryjne izolaty endofityczne z *Chelidonium majus* L. zdolne są do produkcji biosurfaktantów, wykazując przy tym bardzo wysokie aktywności degradacyjne względem węglowodorów (główny cel pracy)
2. Wykazanie korzystnego wpływu endofitycznego glikolipidu na wzrost roślin jadalnych. Optymalne 0,2% stężenie biosurfaktanta powoduje wielokrotne zwiększenie wzrostu wytypowanych roślin jadalnych (fasola, rzodkiewka, burak ćwikłowy), stanowiąc zachętę do aplikacji tego glikolipidu w rolnictwie.
3. Wykorzystanie odpadu przemysłu browarniczego (młóto browarnicze) do produkcji biosurfaktanta, co stanowi element gospodarki obiegu zamkniętego tego przemysłu.

Autor przestrzega jednocześnie przed wyprowadzaniem zbyt ogólnych wniosków z przeprowadzonych badań. Słusznie zwraca uwagę, że okres prowadzenia doświadczeń był dość krótki, jak na stosowane procesy bioremediacji gleb. Także istotny jest okres zalegania zanieczyszczeń w glebie przed rozpoczęciem bioremediacji, albowiem ze wzrostem tego okresu maleje biodostępność zanieczyszczenia. Także prowadzenie doświadczeń z jednym tylko szczepem bakterii zaleca wstrzeźliwość w kreowaniu uogólniających wniosków. Tym niemniej bezdyskusyjnie autor dowiódł tezę, że użycie biosurfaktanta w procesach bioremediacji gleby zanieczyszczonej węglowodorami wspomaga ten proces, a także może sprzyjać rozwojowi roślin zasiedlającej teren poddawany bioremediacji.

Bardzo dobry odbiór pracy (pomimo jej nadmiernej objętości) zmniejszył mankament jaki ujawnił się w omawianym rozdziale pracy (6. Omówienie i dyskusja wyników). Otóż w wielu miejscach Autor powołuje się na publikacje, które jednak nie zostały zamieszczone w wykazie wykorzystanego piśmiennictwa (punkt 9. Literatura). Nawet najnowsza wskazana w dyskusji wyników pozycja Promotorki Doktoranta nie znalazła się w wykazie literatury (Marchut-Mikołajczyk i in., 2021). Te zauważone przeze mnie braki dotyczą następujących pozycji:

Strona 181- [Perez i Rodriguez, 2018].

Strona 183 - [Marchut-Mikołajczyk i in. 2021].

Strona 189 - [Gahesmi i in., 2019].
Strona 192 - [Marchut-Mikołajczyk i in., 2021].
Strona 193 - [Pathak i Keharia, 2014]; w wykazie literatury są dwie pozycje tych samych autorów z 2014, więc nie wiadomo o którą chodzi.
Strona 193- [Farhan i in., 2016].
Strona 196 - [Sharma i in., 2015]; w wykazie literatury są dwie pozycje tych samych autorów z 2015, więc nie wiadomo o którą chodzi.
Strona 201- [Bünemann i in., 2018].
Strona 203 - [Bücker et al., 2011].
Strona 204 - [Margesin i in., 2000; Margesin i in. 2005].
Strona 203 i 204 - [Bücker et al., 2011].
Strona 215 - [Lin i in., 2011; Scheibenbogen i in., 1994; Van Dyke i in., 1993; Whang i in., 2008], [Déziel i wsp., 1996], [Bezza i Chirwa, 2016].
Strona 216 - [Khanna i wsp. 2011; Maliji i wsp., 2013].

To blisko 20 publikacji w tym rozdziale. W innych rozdziałach pracy nie sprawdzałem dokładnie czy wszystkie zamieszczone w tekście pozycje występują w wykazie literatury. Nie miałem również cierpliwości sprawdzać odwrotną zależność tzn. czy wszystkie 358 (!) pozycje w wykazie literatury znajdują się w tekście rozprawy. Mam nadzieje, że uczyni to jej autor.

Generalnie praca napisana jest dobrze, bez większej liczby usterek redakcyjnych. Drobne usterki (głównie „literówki”) znalazłem na stronach:13,24,75,122,148,192,194, 199, 239 i 242. Jak na tak obszerny maszynopis jest to znikoma liczba.

Wniosek końcowy

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pana Piotra Drożdżyńskiego stwierdzam, że Doktorant trafnie wybrał tematykę badań, jasno sformułował cel pracy, dobrze zaplanował i wykonał doświadczenia, wykazał się umiejętnością interpretacji i dyskusji wyników oraz wyciągania właściwych wniosków, a także umiejętnie sformułował podsumowanie pracy. W konsekwencji stwierdzam, że Autor swoją rozprawą udowodnił umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych, a przedstawiona rozprawa rozszerza wiedzę w zakresie wykorzystania endofitycznego biosurfaktantu w rolnictwie do wspomagania wzrostu roślin (zmniejszając więc zastosowanie chemicznych nawozów), w przemyśle spożywczym do ochrony powierzchni przed bakteriami oraz w ochronie środowiska do degradacji węglowodorów i jednocześnie rekultywacji gleby w celu jej ponownego zagospodarowania. Rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Rozprawa ta spełnia więc wymagania Ustawy o tytule naukowym i stopniach naukowych, a w szczególności art.13 Ustawy z dnia 14.03 2003 oraz odpowiada wymaganiom &5 Rozporządzenia Ministra Edukacji Narodowej i Sportu z dnia 15.01.2004. Stawiam więc wniosek o dopuszczenia Pana mgr inż. Piotra Drożdżyńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



