



prof. dr hab. Agnieszka Mrozik
Instytut Biologii, Biotechnologii
i Ochrony Środowiska
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Śląski
ul. Jagiellońska 28
40-032 Katowice

Katowice, dnia 14 września, 2021 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. PIOTRA DROŹDŻYŃSKIEGO

pt.: Biosurfaktanty otrzymywane z endofitycznych bakterii wyizolowanych z *Chelidonium majus* L. – produkcja i zastosowanie

Podstawą formalną wykonania recenzji jest pismo Pani dr hab. inż. Anny Diowkszej, prof. uczelni, Dziekana Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej z dnia 8 sierpnia, 2021 roku. Przedmiotem recenzji jest rozprawa doktorska mgr inż. Piotra Drożdżyńskiego pt. Biosurfaktanty otrzymywane z endofitycznych bakterii wyizolowanych z *Chelidonium majus* L. – produkcja i zastosowanie, wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. inż. Olgi Marchut-Mikołajczyk.

Głównym obiektem badawczym prac Doktoranta były bakterie endofityczne, wyizolowane z wieloletniej rośliny o właściwościach leczniczych - glistnika jaskółcze-ziele (*Chelidonium majus* L.) - pospolicie występującego na obszarze całej Polski. Biorąc pod uwagę biologiczne znaczenie endofitów w promowaniu wzrostu roślin i niewspółmiernie małą wiedzę na temat ich zdolności do syntezy związków powierzchniowo czynnych oraz degradacji zanieczyszczeń węglowodorowych, podjęcie badań mających na celu pozyskanie i zidentyfikowanie nowych szczepów bakterii o pożądanym właściwościach oraz zbadanie ich przydatności we wspomaganej biosurfaktantami bioremediacji gleby skażonej węglowodorami jest jak najbardziej aktualne i wpisuje się w ogólny nurt zagadnień mikrobiologii i biotechnologii środowiskowej.

Przedstawiona do recenzji dysertacja została przygotowana w sposób klasyczny dla doktorskich prac eksperymentalnych i zawiera 11 podstawowych rozdziałów: streszczenie w języku polskim, streszczenie w języku angielskim, wprowadzenie, przegląd literatury, cel



pracy, materiały i metody, wyniki, omówienie i dyskusję wyników, wnioski, podsumowanie i spis literatury. Łącznie wraz ze spisem treści, wykazem skrótów, spisem tabel, rysunków oraz wykresów praca liczy 251 stron.

W rozpoczynającym pracę „Wprowadzeniu” Autor wskazuje na konieczność ograniczenia produkcji surfaktantów syntetycznych wykorzystywanych powszechnie w wielu gałęziach przemysłu oraz rolnictwie i zastąpieniu ich odpowiednikami pochodzenia mikrobiologicznego o niewątpliwie większych zaletach, takich jak: niska toksyczność, stabilność w zmiennych warunkach, brak kumulacji w organizmach żywych, biokompatybilność i biodegradowalność. Poza tym unikalna struktura biosurfaktantów może nadawać im też inne cenne właściwości, np. antybakteryjne, antynowotworowe czy antyadhezyjne, jakich nie posiadają surfaktanty syntetyczne, a które zwiększają ich potencjał aplikacyjny w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym, rolnictwie, czy ochronie środowiska. Za innowacyjne źródło takich bezpiecznych i przyjaznych środowisku surfaktantów Doktorant uznał bakterie zasiedlające wnętrze rośliny *Chelidonium majus* L. i ich charakterystyce i produkcji poświęcił część swoich kilkuletnich badań.

Rozdział 2 to obszerny przegląd literatury, obejmujący cztery oddzielne części tematyczne. W pierwszej części Autor definiuje endofity, dokładnie opisuje mechanizmy kolonizacji roślin przez bakterie, przedstawia różne typy oddziaływań bakterie-roślina, wymienia substancje czynne produkowane przez endofity i wskazuje na możliwość ich praktycznego wykorzystania w różnych dziedzinach życia. Druga część poświęcona jest szczegółowej charakterystyce kolejno surfaktantów syntetycznych i biosurfaktantów, ich produkcji i wykorzystaniu w zwiększaniu efektywności biodegradacji różnych związków węglowodorowych. Trzecia część tego rozdziału to charakterystyka wybranych węglowodorów pod względem właściwości fizykochemicznych, źródeł występowania i wpływu na środowisko. Ostatnia z kolei część to przegląd biologicznych metod usuwania zanieczyszczeń węglowodorowych, parametrów wpływających na efektywność tego procesu i mikroorganizmów o unikatowych zdolnościach degradacyjnych. W moim odczuciu przegląd literatury jest zbyt obszerny (48 stron), zawiera wiele powtarzających się informacji w oddzielnych rozdziałach oraz niesie wiele treści niezwiązanych bezpośrednio z tematyką pracy. Na przykład dokładny opis wpływu węglowodorów na fizjologię zwierząt i człowieka wydaje się zupełnie zbędny, gdyż takie badania nie były przedmiotem rozprawy. Niemniej jednak zaprezentowane treści są dobrym wprowadzeniem do kolejnych rozdziałów pracy, w tym metodyki i podsumowującej pracę dyskusji wyników.



Głównym celem rozprawy było opracowanie warunków syntezy biosurfaktantu pozyskanego z endofitycznych bakterii wyizolowanych z synantropijnej rośliny *Chelidonium majus* L. z wykorzystaniem odpadów/półproduktów rolno-spożywczych oraz zbadanie jego potencjału biotechnologicznego pod kątem aplikacji w przemyśle spożywczym oraz ochronie środowiska. Rozdział ten Doktorant poprzedził, niepotrzebnym moim zdaniem, 1-stronicowym wstępem teoretycznym, zawierającym wcześniej prezentowane już treści. Ze względu na wieloaspektowość prowadzonych badań lepszym rozwiązaniem od zamieszczonego w pracy byłoby sformułowanie kilku hipotez badawczych ze szczegółowo sprecyzowanymi działaniami zmierzającymi do ich weryfikacji. W obecnej formie cel pracy nie odzwierciedla wyczerpująco zakresu wszystkich zaplanowanych i przeprowadzonych eksperymentów, szczególnie tych dotyczących biodegradacji węglowodorów w podłożu płynnym oraz glebie z wykorzystaniem bakterii *Gordonia alkanivorans* oraz endofitycznego szczepu *Bacillus pumilus* 2A. W przypadku wielowątkowości badań dobrą praktyką jest również zaprojektowanie dodatkowego, graficznego planu badawczego z uwzględnieniem wszystkich etapów badań i prowadzonych analiz. Taki schemat znacznie lepiej wprowadziłby czytelnika w wielokierunkowy zakres prowadzonych prac i ułatwiłby śledzenie przebiegu kolejnych serii eksperymentów. Mimo tej enigmatyczności w opisie eksperymentów bioremediacyjnych, ogólny cel pracy i zadania służące jego realizacji można uznać za bardzo ambitne i z sukcesem konsekwentnie etapowo realizowane.

Do realizacji postawionego celu Doktorant wykorzystał szereg metod mikrobiologicznych, biochemicznych, chemicznych i fizycznych, stosownie do prowadzonych pomiarów i analiz. Bardzo dokładnie i opisał skład podłoży hodowlanych, dobrze scharakteryzował odpady rolno-spożywcze i substraty węglowodorowe (olej napędowy, przepracowany olej silnikowy, olej krezotowy typu B i smar kolejowy), etapy izolacji i identyfikacji endofitów z materiału roślinnego, metody badania składu i aktywności biosurfaktantów oraz warunki i monitoring procesu bioremediacji w różnych układach eksperymentalnych. Wysoko oceniam próbę optymalizacji procesu syntezy biosurfaktantu eksperymentalną metodą Taguchi, prowadzącą do otrzymania dużej ilości aktywnego biologicznie i stabilnego związku oraz wykorzystanie metod GC/MS i spektrometrii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) do oznaczenia jego składu chemicznego. Niestety nie znalazłam w tej części pracy żadnej informacji na temat typu, miejsca poboru i właściwości fizykochemicznych gleby (m. in. składu granulometrycznego, pH, wilgotności zawartości materii organicznej), w której prowadzono eksperymenty bioremediacyjne, a



przecież to niezwykle istotne parametry wpływające na wydajność usuwania zanieczyszczeń z tego środowiska. Ponadto dość ogólnie Doktorant przedstawił warunki wspomaganej biosurfaktantem bioaugmentacji skażonej gleby bez ujawnienia składu inokulum, liczebności wprowadzanych bakterii, czy rodzaju biosurfaktantu. Z tego też względu tę część metodyki uważam za zbyt ogólnikową.

Umiejętne zaplanowanie badań i konsekwentne ich realizowanie dostarczyły szeregu oryginalnych wyników istotnych pod względem poznawczym i aplikacyjnym. Wyniki te Doktorant zestawił w 23 tabelach, 25 rysunkach i 51 wykresach. Uważam za niepotrzebne rozgraniczanie rysunków od wykresów, gdyż zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami do wszystkich rysunków, wykresów i fotografii powinno się używać jednego określenia w całej pracy, albo rys. albo ryc. Materiał graficzny zaprezentowany został w sposób czytelny i przejrzysty. Na szczególną pochwałę zasługuje bardzo estetyczny i staranny sposób ich wykonania. Uzyskane wyniki Autor poddał typowym dla prowadzonych badań analizom statystycznym (jednoczynnikowej analizie ANOVA i testowi Tukeya). Za najważniejsze osiągnięcia pracy uważam: (1) wyizolowanie z rośliny *Chelidonium majus* L. endofitycznego szczepu bakterii *Bacillus pumilus* 2A o udokumentowanej po raz pierwszy zdolności do produkcji biosurfaktantu o charakterze glikolipidu, (2) poznanie struktury chemicznej oraz właściwości tego związku, (3) optymalizację wydajnej produkcji biosurfaktantu (8,68 g/l) w skali ćwierć-technicznej z wykorzystaniem młota browarnianego jako źródła węgla, azotanu amonu jako źródła azotu, 5% inokulum bakterii, w warunkach pH = 6 i temperaturze 30 °C, (4) potwierdzenie zdolności szczepu 2A do promowania wzrostu roślin wskaźnikowych oraz roślin jadalnych (fasoli, rzodkiewki i buraka), (5) udokumentowanie wykorzystania endofitycznego biosurfaktantu do wspomagania procesu mikrobiologicznej degradacji różnych mieszanin węglowodorowych w środowisku glebowym oraz (6) zaproponowanie aktywności katalazy jako pośredniego wskaźnika do śledzenia zmian stężenia zanieczyszczenia w oczyszczanym środowisku. Kompleksowe badania i uzyskane wyniki potwierdziły wysoki potencjał aplikacyjny szczepu 2A w bioremediacji skażonych węglowodorami środowisk oraz wskazały na możliwość wykorzystania surowców odpadowych do jego produkcji.

W kolejnym rozdziale „Omówienie i dyskusja wyników” Doktorant przeprowadził dyskusję uzyskanych wyników według postawionych sobie celów. Sposób dyskusji wskazuje na dojrzałość naukową Doktoranta i dobrą znajomość literatury światowej, dotyczącej prezentowanych zagadnień. Rozdział ten ukazuje Doktoranta jako krytycznego obserwatora,



zdającego sobie sprawę z wielu problemów metodycznych towarzyszącym badaniom mikroorganizmów. Szkoda że Autor nie podzielił tego obszernego stronicowo rozdziału (42 strony) na odrębne tematycznie podrozdziały, dotyczące omawianych zagadnień. To znacznie ułatwiłoby czytanie i konfrontowanie zakresu wielowątkowości własnych badań z wynikami prac innych autorów. Bez potrzeby również Doktorant nazywa siebie w tym rozdziale Autorem pracy, skoro na pierwszej stronie dysertacji widnieje imię i nazwisko jej autora. To stwarza momentami niejasności w zrozumieniu tekstu, jakiego konkretnie autora Doktorant miał na myśli.

W oparciu o przeprowadzone badania i analizy Autor pracy sformułował 16 wniosków, które właściwie są podsumowaniem otrzymanych wyników. W moim odczuciu brakuje syntetycznych wniosków, które uogólniłyby prezentowane wyniki.

W rozdziale „Literatura” zwraca uwagę imponująca liczba publikacji (358), obejmująca zarówno prace o znaczeniu historycznym, jak i te prezentujące najnowsze osiągnięcia. Spis piśmiennictwa byłby jeszcze obszerniejszy, gdyby Doktorant zamieścił w nim wszystkie pozycje cytowane w tekście rozprawy. W rozdziale tym brakuje ponad 50 pozycji zacytowanych we wszystkich rozdziałach pracy, a 18 prac ze spisu literatury nie zostało przywołanych w tekście. Mimo tych uchybień, pozycje literaturowe są właściwie dobrane do wprowadzenia w badany problem oraz oceny i konfrontacji otrzymanych wyników z wynikami innych autorów.

W trakcie czytania pracy nasunęły mi się pewne pytania i komentarze, które wymagają wyjaśnienia;

1. Dlaczego Doktorant wyeliminował szczep *Bacillus cereus* z dalszych badań? W jakich warunkach szczep ten wywołuje chorobę u ludzi i czy warunki te z zachowaniem odpowiednich środków ostrożności są podstawą do wykluczenia go z prac laboratoryjnych?
2. Co Doktorant rozumie pod pojęciem „strefa ryzosferowa łodygi”? Czy takie pojęcie jest prawidłowe? Proszę o zdefiniowanie pojęć ryzosfera i ryzoplana oraz wskazanie strefy granicznej między korzeniem a łodygą.
3. Proszę o wyjaśnienie używanego w pracy angielskiego pojęcia „downstream processing”.
4. W jakich typach gleby prowadzono badanie wpływu biosurfaktantu na wzrost roślin wskaźnikowych oraz eksperymenty bioremediacyjne? Dlaczego wzrostu roślin



jadalnych w obecności biosurfaktantu nie prowadzono w identycznych warunkach jak roślin wskaźnikowych?

5. W jakim dokładnie celu Doktorant przeprowadził wspomaganą biosurfaktantem bioaugmentację sterylnej gleby inokulowanej bakteriami skoro takie gleby nie występują naturalnie w przyrodzie?
6. Które ze swoich osiągnięć Doktorant uważa za najcenniejsze i w jaki sposób zamierza w najbliższej przyszłości wykorzystać wyniki przeprowadzonych badań?

Inne najważniejsze uwagi i sugestie natury szczegółowej:

1. Czy prawidłowe jest stosowanie pojęć „bakteryjne mikroorganizmy” i „grzybowe mikroorganizmy”, „fizjologiczne wiązania”, wysokość inokulum, kielkowanie łodygi (str. 22, 49, 98, 99, 100, 191, 220)?
2. Analogicznie do zaprezentowanych kart charakterystyki POS, KREOZAT i SMAR, w rozdziale 4.1.4.2. niezbędne wydaje się również zamieszczenie karty ON.
3. Metodę Bradford'a (1976) stosowano raczej do oznaczenia stężenia białka w próbie, a nie do wykrywania obecności wiązań peptydowych w białkach (do tego służy reakcja biuretowa - Piotrowskiego) – str. 79.
4. Informacje zawarte w podrozdziale 5.1. stanowią powtórzenie treści zawartych w części metodycznej pracy i są zbędne. Podobnie inne treści, które Autor wskazuje jako metodyczne. Za niepotrzebne uważam również w tym miejscu odwoływanie się do części literaturowej pracy. Na rys. 16 nie podano rodzaju izolatu na konkretnych podłożach hodowlanych.
5. Według powszechnie przyjętej zasady rysunki i tabele zamieszcza się po odpowiednim cytowaniu ich w tekście (wykresy 6 i 7, str. 120, tabele 25 – 28, rysunki 31 – 34 i 35 - 37). Tabela 27 (c.d.) powinna być tabelą 24 (c.d.).
6. Na wykresach 8 – 29 oraz 34 – 49 niepoprawny jest opis osi OX, czyli biodegradacja/ bioremediacja [doba]. Pojęcia te powinny być zastąpione czasem mierzonym w dniach, bo taką zależność mierzonego parametru od czasu one obrazują.
7. Moje zastrzeżenia budzi także sposób prezentowania poszczególnych parametrów w tabelach, np. opis w Tabeli 27 „Ubytek węglowodorów [%] Kreozot, Bioremediacja [doba]” w jednym miejscu jest nieprzejrzysty. Podobna uwaga dotyczy tabel 23, 24, 29 i 31.



8. Sugerowałabym również zastąpienie zastosowanych skrótów układów eksperymentalnych: K, K+BS, 2A, 2A+BS bardziej odpowiadającymi warunkom eksperymentu skrótami, np. GK (gleba wyjściowa), GK+BS, GK+2A, GK+2A+BS.
9. Za nieprawidłowy uważam sposób cytowania literatury przy opisie wyników innych autorów. Doktorant powszechnie stosuje podwójne cytowanie w jednym zdaniu, co nie jest normalną praktyką (np. str. 26, 36, 37, 40, 44, 58, itd). Co więcej, nie stosuje chronologii i/lub kolejności alfabetycznej w czasie cytowania wielu prac w konkretnych nawiasach i zasady cytowania kilku prac jednego autora (np. str. 21, 22, 27). Niekonsekwentnie też używa sposobu cytowania pozycji wieloautorskich „i in.,” i „et al.,” lub nazwisko autora i współpracownicy.
10. Z przykrością stwierdzam, że Doktorant nie dołożył należytej staranności przy opracowaniu rozdziału 9 „Literatura” i nie przestrzegał zasady, że wszystkie pozycje spisu literatury powinny być edytowane w ten sam sposób. W większości wymienianego piśmiennictwa tytuły czasopism pisane są skrótami, w wielu przypadkach podawane są całe ich nazwy, niekiedy ich brak (np. pozycja 249). W większości prac łacińskie nazwy gatunkowe nie są napisane kursywą. Ogólnie w tym rozdziale panuje duży nieporządek.
11. Ponadto w pracy jest wiele błędów interpunkcyjnych, stylistycznych, nieprecyzyjnych sformułowań oraz fragmentów wymagających zdolności intuicyjnego orientowania się w przedstawianych treściach. Moje uwagi dotyczą także błędów w nazwach gatunkowych mikroorganizmów (str. 42, 46, 48, 83), nieujednoliconego sposobu wyrażania jednostek (str. 37, 64), braku wyjaśnienia po raz pierwszy użytych skrótów (str. 77) i konsekwencji w ich stosowaniu w całej pracy, braku pewnych szczegółów metodycznych i odnośników literaturowych np. dotyczących składu podłoża hodowlanych (tabele 4 – 8), zasady testu mydeł miedziowych (str. 103), składu buforu PBS (str. 73), czy nieprecyzyjnego opisu rysunków (np. rys. 18 – brak wskazania na wykresie odpowiednio 1 i 2).

Moje uwagi krytyczne i komentarze nie podważają pozytywnej oceny wartości naukowej pracy, a są jedynie pytaniami i uwagami do dyskusji. Mogą ewentualnie być pomocne podczas przygotowania artykułów do druku.



Ocena końcowa pracy

Uzyskane wyniki stanowią niewątpliwie oryginalne i cenne osiągnięcie naukowe Doktoranta w zakresie mikrobiologii i biotechnologii środowiskowej. Doktorant wykazał dobre przygotowanie teoretyczne w zakresie badanych zagadnień i przeprowadził wieloaspektowe, czasochłonne eksperymenty wymagające doświadczenia z zakresu stosowanych metod tradycyjnych i molekularnych. Wykazał, że potrafi rozwiązywać problemy naukowe, posiada odpowiedni warsztat badawczy oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy badawczej. Uważam, że rozprawa zawiera elementy nowości, które nie tylko wzbogacają i pogłębiają dotychczasową wiedzę o endofitach oraz produkowanych przez nie biosurfaktantach, ale także mogą stanowić podstawę do opracowania na większą skalę nowych technologii i wdrożenia ich do rewitalizacji/rekultywacji terenów zanieczyszczonych niebezpiecznymi związkami węglowodorowymi.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana mgr inż. Piotra Drożdżyńskiego pt.: „Biosurfaktanty otrzymywane z endofitycznych bakterii wyizolowanych z *Chelidonium majus* L. – produkcja i zastosowanie” stanowi ważny wkład w rozwój nowoczesnych metod biologicznych do remediacji środowisk o dużym stopniu zanieczyszczenia mieszaninami różnych węglowodorów, w tym wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Przedłożona przez Doktoranta praca świadczy o jego naukowej dojrzałości, praktycznej znajomości metod badawczych oraz obszernej wiedzy teoretycznej związanej z podjętymi zagadnieniami. Dodatkowo należy podkreślić, że uzyskane w pracy wyniki mają nie tylko wartość poznawczą, ale również potencjalnie aplikacyjną. Dlatego uważam, że spełnia ona wymogi art. 14 ust. 2 pkt 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669), a stopień doktora może być nadany w dziedzinie i dyscyplinie określonej w przepisach wydanych na podstawie art. 5 ust. 3 tej ustawy. W związku z powyższym przedstawiam Radzie ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej wniosek o dopuszczenie mgr. inż. Piotra Drożdżyńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.