

dr hab. inż. Edyta Skrzypek, prof. IFR PAN
Instytut Fizjologii Roślin im. F. Górskiego
Polskiej Akademii Nauk
Zakład Biotechnologii
ul. Niezapominajek 21
30-239 Kraków

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Janczak pt. „Znaczenie mikroorganizmów ryzosferowych i roślin w biodegradacji tworzyw polimerowych” wykonanej w Zakładzie Genetyki Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Mikołaja Kopernika we współpracy z Instytutem Inżynierii Materiałów Polimerowych i Barwników w Toruniu, pod kierunkiem dr hab. Grażyny Dąbrowskiej i dr Anety Raszkowskiej-Kaczor

Zastąpienie tworzyw naturalnych w produkcji m.in. przedmiotów codziennego użytku tworzywami sztucznymi miało na celu przedłużenie okresu ich używania, a paradoksalnie przedmiotów tych pozbywamy się szybko. Z ponad 5,5 mln ton opakowań wprowadzonych na rynek w Polsce w 2017 r., 45% trafiło do gospodarstw domowych. Ciągłe nie możemy poradzić sobie ze skutecznym usuwaniem przedmiotów z tworzy sztucznych, których rozkład potrafi trwać nawet kilkaset lat. Wysiłek w tym kierunku zostaje głównie skierowany na zachęcanie do zbiórki, segregacji i recyklingu opakowań z tworzyw polimerowych, a nie na biodegradacji już istniejących odpadów. W Polsce ciągle podstawowym sposobem postępowania z odpadami jest składowanie. W ten sposób unieszkodliwia się 44 % odpadów, podczas gdy w Unii Europejskiej 28 %. W kwietniu bieżącego roku grupa firm wprowadzających na rynek produkty w opakowaniach z tworzyw sztucznych oraz organizacje branżowe i pozarządowe utworzyła Polski Pakt na rzecz zrównoważonego wykorzystywania tworzyw sztucznych, którego celem jest wypracowanie sposobów na bardziej zrównoważone wykorzystywanie tworzyw sztucznych w polskiej gospodarce. Również zatwierdzenie przez Radę Unii Europejskiej dyrektywy w sprawie ograniczenia wpływu niektórych produktów z tworzyw sztucznych na środowisko, zakłada m.in., że do końca 2029 r. zbiórka i recykling opakowań plastikowych po napojach ma wynieść 90%, wprowadzony zostanie zakaz stosowania niektórych produktów jednorazowego użytku z tworzyw sztucznych, a wszystkie odpady opakowaniowe z tworzyw sztucznych powinny nadawać się do recyklingu do końca 2030 r.

Niewątpliwie korzystnym procesem, dzięki któremu odpady nie muszą być składowane przez wiele lat i zanieczyszczać środowiska naturalnego jest biodegradacja tworzyw polimerowych dokonywana za pośrednictwem organizmów żywych, m.in. bakterii i grzybów.

Biodegradacja może jednak zachodzić tylko w sprzyjających dla w/w organizmów warunkach środowiskowych.

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Janczak to bardzo ambitne badania dotyczące opracowania metody przyspieszania biodegradacji tworzyw polimerowych z udziałem bakterii i grzybów ryzosferowych promujących wzrost roślin uprawianych na biomasę. W badaniach wyselekcjonowano mikroorganizmy wykazujące zdolność do wzrostu w obecności tworzyw polimerowych i syntezy enzymów hydrolitycznych zaangażowanych w ich biodegradację, analizowano zdolności do przeżycia bakterii w warunkach stresowych, oceniono wpływ mikroorganizmów na przyrost biomasy rzepaku, wierzby wiciowej i miskanta olbrzymiego oraz określono wybrane parametry gleby po częściowym rozkładzie polimerów dokonanym za pośrednictwem mikroorganizmów. Prezentowane badania mają charakter interdyscyplinarny, łączą ze sobą chemię, fizykę, genetykę, mikrobiologię oraz fizjologię roślin. Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Janczak to dalszy etap badań dr hab. Grażyny Dąbrowskiej z Katedry Genetyki UMK we współpracy z prof. dr hab. Katarzyną Hrynkiewicz z Zakładu Mikrobiologii UMK dotyczący zastosowania zmodyfikowanych bakterii glebowych w stymulacji procesów wzrostu, rozwoju i ochrony roślin przed niekorzystnymi czynnikami środowiska oraz do poprawy skuteczności fitoremediacji gleb.

Prezentowane w recenzowanej rozprawie badania mgr Katarzyny Janczak znalazły wsparcie finansowe Narodowego Centrum Nauki (projekt Preludium 11 „Nowe zastosowanie rzepaku i bakterii ryzosferowych w biodegradacji PLA i PET”) oraz Instytutu Inżynierii Materiałów Polimerowych i Barwników w Toruniu dzięki czemu mogą w przyszłości przyczynić się do opracowania i wdrożenia do praktyki efektywnej metody biodegradacji tworzyw polimerowych.

Ocena poszczególnych rozdziałów pracy

Oceniana praca zawiera elementy typowe dla rozpraw doktorskich oraz spełnia wymagania formalne i merytoryczne stawiane tego typu opracowaniom. Recenzowana dysertacja obejmuje 191 stron, a wyniki prezentowane są na 34 rycinach i fotografiach oraz w 17 tabelach. Dodatkowo, obszerna część wyników przedstawiona jest w podrozdziale „Załączniki” w formie 27 tablic z fotografiami i tabel. Autorka cytuje w dysertacji 361 pozycji literatury, w tym aż 12 pozycji z własnym współautorstwem, co świadczy o dociekliwości i zaangażowaniu w pracę naukową Doktorantki.

Dysertacja pani mgr Katarzyny Janczak dotyczy biodegradacji tworzyw polimerowych poprzez wybór szczepów bakteryjnych i grzybów makroskopowych wykazujących zdolność do wzrostu w ich obecności, określenia zdolności bakterii do syntezy enzymów hydrolitycznych (amylazy, celulazy, lipazy, pektynazy) zaangażowanych w biodegradację tworzyw oraz wykazania zmian biodegradacyjnych na tworzywach. W pracy dokonano też analizy zdolności do przeżycia bakterii w warunkach stresowych oraz charakterystyki wzrostu i kondycji *Brassica napus* L., *Salix viminalis* L. i *Miscanthus x giganteus* uprawianych na biomasę oraz ustalenie ich udziału w biodegradacji tworzyw w glebie ogrodowej i kompostowej. Określono także zmiany zachodzące w glebie pod wpływem tworzyw sztucznych i mikroorganizmów poprzez

przeanalizowanie wybranych parametrów gleby np. zawartość makro- i mikroelementów, odczynu i potencjału redoks.

Rozprawę doktorską otwiera spis treści, po którym Autorka umieściła streszczenia w języku polskim i angielskim, a następnie „Wykaz stosowanych skrótów”.

We „Wstępie” liczącym 32 strony Autorka zawarła przegląd literatury, pozwalający na wprowadzenie czytelnika w istotne problemy związane z przedmiotem pracy. Autorka omówiła bardzo szczegółowo zagadnienia dotyczące zapotrzebowania na tworzywa polimerowe w Europie i Polsce, omówiła zalety i wady ich stosowania jak również metody ich utylizacji. Autorka scharakteryzowała rodzaje tworzyw polimerowych, ich zastosowanie w przemyśle i degradację. Opisała również rolę mikroorganizmów w biodegradacji tworzyw i bioremediacji środowiska, ekspresję genów odpowiedzi ścisłej u bakterii rosnących w obecności tworzyw polimerowych, metody badania biodegradacji tworzyw polimerowych i przykłady ich zastosowania oraz znaczenie czynników środowiskowych w remediacji gleb zanieczyszczonych odpadami tworzyw polimerowych. Przegląd literatury został opracowany starannie i wnikliwie, uwzględniając najnowsze osiągnięcia mające znaczenie dla biodegradacji tworzyw polimerowych.

Autorka umiejętnie przedstawiła cel badań z podziałem na cele szczegółowe, które stanowiły odrębne etapy badań prowadzące do określenia zmian biodegradacyjnych na tworzywach polimerowych, charakterystyki gleby, w której tworzywa ulegały biodegradacji oraz określenia kondycji i masy roślin oraz ich udziału biodegradacji tworzyw. Cel pracy sformułowano logicznie i koresponduje on z założeniami metodycznymi oraz wnioskami.

Materiał i metodyka badań są właściwie dobrane do celu pracy. Doktorantka stosowała jako materiał badawczy folie z pięciu rodzajów tworzyw polimerowych: polilaktydu (PLA), polikaprolaktonu (PCL), polihydroksymaślanu (PHB), politereftalanu etylenu (PET) i polietylenu (PE). W badaniach dotyczących degradacji tworzyw analizowała aż 23 szczepy bakteryjne oraz 4 szczepy grzybów mikroskopowych wyizolowanych z gleb zanieczyszczonych lub niezdegradowanych antropogenicznie. Spośród nich do badań wazonowych i polowych wybrała bakterie *Arthrobacter* sp. i *Serratia plymuthica* oraz grzyby ektomykoryzowe *Clitocybe* sp. i *Laccaria laccata*. Ocenę udziału roślin w biodegradacji tworzyw przeprowadziła z wykorzystaniem roślin uprawianych na biomase: miskanta olbrzymiego, wierzby wiciowej oraz rzepaku ozimego odm. Harry. Techniki badawcze opisała precyzyjnie, począwszy od metod tłoczenia folii, selekcji mikroorganizmów i oceny ich aktywności metabolicznej, poprzez cały szereg metod oceny stopnia biodegradacji folii (wydzielania CO₂ w bioreaktorach, analizę pierwiastkową powierzchni folii z zastosowaniem spektroskopii rentgenowskiej z dyspersją energii, prób wytrzymałościowych na rozciąganie, spektroskopii w podczerwieni, dyfrakcji rentgenowskiej, przepuszczalności gazów H₂O↑, O₂ i CO₂, pomiar temperatury topnienia i zeszklenia), do oceny wybranych parametrów gleby (pH, potencjał redox, liczebność bakterii i grzybów, zawartość makro- i mikroelementów) oraz biomasy i zawartości azotu, potasu, fosforu, wapnia i magnezu w części nadziemnej roślin. Dodatkowo Doktorantka określiła u szczepu *Serratia plymuthica*, wykazującego największy potencjał do biodegradacji tworzyw ekspresję genów *Rsh* (odpowiedzialnych za przetrwanie w warunkach stresowych i

komunikowanie się mikroorganizmów) i *RpoN* (zaangażowanego w wykorzystywanie alternatywnych źródeł węgla) w obecności tworzyw polimerowych.

Istotność różnic między średnimi została określona na podstawie testu Tukey'a. Doktorantka wykonała również analizę składowych głównych (PCA) w celu określenia współzależności między parametrami fizyko-chemicznymi badanych folii, a inokulacją mikroorganizmami ryzosferowymi, rodzajem gleby i roślin.

Prezentacja uzyskanych wyników zajmująca 63 strony jest dobrze uporządkowana i przejrzysta. Doktorantka dowiodła, że obecność wybranych mikroorganizmów nie tylko przyspiesza biodegradację tworzyw polimerowych, ale stymuluje również wzrost roślin i akumulację azotu, fosforu i potasu w pędach. Pani mgr K. Janczak wyselekcjonowała po dwa szczepy bakterii (*Arthrobacter sulfonivorans*, *Serratia plymuthica*) i grzybów (*Clitocybe* sp., *Laccaria laccata*) charakteryzujące się zdolnością do wzrostu na badanych tworzywach, tworzących na nich biofilm i w największym stopniu degradujące strukturę folii. Zdolność mikroorganizmów do degradacji tworzyw polimerowych potwierdziła licznymi metodami biochemicznymi, spektrometrycznymi i chromatograficznymi. Wykazała, że wybrane mikroorganizmy produkują enzymy hydrolityczne, przy czym bakterie charakteryzowały się wysoką aktywnością lipolityczną, a grzyby celulityczną.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że wykazała u bakterii *Serratia plymuthica* zwiększoną ekspresję genu odpowiedzi ścisłej *RelA* w obecności polilaktydu (PLA) oraz spadek ekspresji genu *SpoT* w obecności politereftalanu etylenu (PET).

Doktorantka wykazała największe zmiany degradacyjne folii PLA i PET stosując inokulację gleby kompostowej *Serratia plymuthica* i *Laccaria laccata* oraz gleby ogrodowej *Arthrobacter sulfonivorans* i *Laccaria laccata* i uprawiając w niej rośliny wierzby wiciowej. Ponadto dowiodła, że w glebie z PLA i PET po inokulacji *Serratia plymuthica* i *Arthrobacter sulfonivorans* wzrosła liczba bakterii o około 20% i spadła grzybów w stosunku do kontroli. Z kolei po inokulacji grzybami *Clitocybe* sp. i *Laccaria laccata* obserwowano spadek o około 20% liczebności bakterii, a wzrost liczebności grzybów.

Ciekawie przedstawiają się również wyniki analizy głównych składowych (PCA) dla parametrów gleby kompostowej i ogrodowej, w których rósł rzepak, miskant i wierzba. Analiza ta wskazała na znaczący i zależny od gatunku rośliny wpływ na badane parametry gleby (pH i potencjał redox oraz liczebność bakterii i grzybów).

Doktorantka udokumentowała też pozytywny wpływ bakterii na wzrost roślin, zawartość pierwiastków N, P, K, Ca i Mg w pędach oraz na wzrost zawartości N, P, K w glebie zanieczyszczonej tworzywami polimerowymi.

Wyniki te są niezwykle cenne, nie tylko z poznawczego, ale i z praktycznego punktu widzenia, stwarzając możliwość wdrożenia opisanej metody biodegradacji tworzyw polimerowych. O dużej wartości uzyskanych wyników świadczy również fakt, iż część z nich została opublikowana w ubiegłym roku w wysokoimpaktowym (IF 3.631) czasopiśmie *International Biodeterioration and Biodegradation*.

W rozdziale „Dyskusja” Autorka poruszyła zagadnienia biodegradacji tworzyw polimerowych przy udziale bakterii i grzybów, aktywności metabolicznej mikroorganizmów,

ekspresji genów odpowiedzi ściślej w obecności tworzyw polimerowych, roli mikroorganizmów i roślin w bioremediacji gleb, wpływu inokulacji gleby mikroorganizmami na jej wybrane parametry fizyko-chemiczne, zmiany biodegradacyjne tworzyw polimerowych (strukturę powierzchni, ubytek masy, wytrzymałość, przepuszczalność) oraz czynniki biotyczne korzystne w bioremediacji gleb zanieczyszczonych tworzywami polimerowymi. Doktorantka przedstawiła umiejętną i wyczerpującą analizę własnych wyników na tle licznie cytowanej literatury, co świadczy o wnikliwym zapoznaniu się z podjętą tematyką badań.

Pani mgr Katarzyna Janczak podsumowała wyniki badań w formie 13 wniosków. Są one sformułowane rzetelnie i adekwatnie do uzyskanych wyników. Niemniej jednak niektóre z nich mają raczej charakter podsumowania wyników niż wniosków.

Z osiągnięć przedstawionej rozprawy doktorskiej, według mnie, na szczególne podkreślenie zasługują:

- wyselekcjonowanie szczepów bakterii ryzosferowych i grzybów zdolnych do wzrostu na badanych tworzywach polimerowych, produkcji enzymów hydrolitycznych i degradacji tworzyw
- wykazanie wzrostu ekspresji genu *RelA* w obecności PLA i spadku ekspresji genu *SpoT* w obecności tworzywa PET szczepu *Serratia plymuthica*
- wykazanie stymulacji przez *Arthrobacte rsulfonivorans*, *Serratia plymuthica* i *Laccaria laccata* wzrostu roślin rzepaku, miskanta olbrzymiego i wierzby wiciowej w obecności tworzyw polimerowych w glebie zarówno w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych jak i polowych
- wykazanie stymulacji przez grzyb *Clitocybe* sp. wzrostu biomasy wierzby wiciowej rosnącej w glebie zawierającej PET o około 50% w porównaniu do gleby nieinokulowanej
- wykazanie, że inokulacja gleby *Arthrobacter sulfonivorans* i *Laccaria laccata* wraz z nasadzeniem wierzby wiciowej znacząco przyspiesza biodegradację tworzyw polimerowych na terenach zanieczyszczonych

Uwagi i pytania

1. Biorąc pod uwagę w/w osiągnięcia proszę Doktorantkę o opinię, która z metod „użyłizacji” tworzyw sztucznych będzie w przyszłości bardziej opłacalna i wdrażana, biodegradacja z udziałem mikroorganizmów glebowych czy recykling? Czy możliwe będzie opatentowanie części wyników i np. wyprodukowanie preparatu na bazie testowanych bakterii i grzybów do biodegradacji tworzyw sztucznych lub wdrożenie metody biodegradacji odpadów na składowiskach z udziałem testowanych roślin i mikroorganizmów?
2. O ile metody i wyniki dotyczące analiz mikrobiologicznych i fizyko-chemicznych tworzyw sztucznych poddanych degradacji zostały opisane bardzo szczegółowo i rzetelnie, to skrupulatności tej zabrakło mi w opisie części pracy nazwanej przez Doktorantkę „fizjologiczną”.

- W części pracy dotyczącej parametrów fizjologicznych roślin brakuje informacji dotyczących liczebności wykonanych analiz, np. ile nasion/szalek, roślin stanowiło powtórzenie, na ilu roślinach wykonano pomiary. Istotność różnic pomiędzy traktowaniami nie została potwierdzona statystycznie. Przy małej liczbie powtórzeń, pomimo niedużych wartości odchyień standardowych różnice między średnimi nie muszą być istotne.
 - Zawartość chlorofilu mierzona urządzeniem SPAD wyrażona jest w postaci tzw. indeksu zieloności liścia. Pomimo, że odczyty SPAD są wprost proporcjonalne do zawartości chlorofilu nie są proste w interpretacji. Szczególną uwagę należy zwrócić na sposób wykonywania pomiarów, a w pracy zabrakło mi takiej informacji, tzn. na którym liściu były wykonywane pomiary, w jakiej części blaszki liściowej (wiązki przewodzące przekłamują pomiar) i ile było tych pomiarów. Nie znalazłam też w pracy informacji dotyczącej natężenia światła w komorze gdzie rosły rośliny. Zwracam na to uwagę, ponieważ fluktuacje zawartości chlorofilu w liściach rzepaku w ciągu 3 miesięcy uprawy mogą być związane z wiekiem liści, na których wykonywano pomiary, a także ich odległością od źródła światła, a nie z rozkładem tworzyw i działaniem bakterii w glebie.
 - Omawiając parametry fizjologiczne roślin inokulowanych i nieinokulowanych rosnących w obecności tworzyw w glebie Doktorantka używa określenia wzrost/spadek długości korzeni, hypokotyli, pędów i biomasy. Nie możemy mówić o spadku długości czy biomasy, one były stałe – miały zahamowany wzrost w porównaniu z roślinami kontrolnymi.
 - Niewątpliwie szybki przyrost masy roślin jest pożądany przy produkcji na cele przemysłowe np. spalanie. Czy w przypadku rzepaku ozimego odm. Harry (nie jarego, jak opisała Doktorantka w „Materiałach i Metodach”) przyspieszenie kiełkowania przez inokulację mikroorganizmami jest korzystne, a jeśli tak to w jakich warunkach, mając na uwadze jesienne zahartowanie roślin do okresu zimy? Czy z doniesień literaturowych znany jest Doktorantce udział mikroorganizmów w procesach hartowania czy rozhartowywania roślin ozimych?
3. Jak Doktorantka sądzi, dlaczego rośliny rzepaku bez względu na obecność folii i mikroorganizmów użytych do inokulacji powodowały wzrost zasolenia gleby? Czym możemy wytłumaczyć kilkukrotnie wyższą zawartość fosforu, potasu i azotu w glebie inokulowanej bakteriami, zwłaszcza *Serratia plymuthica*, w której uprawiano rzepak? Jaka była liczba prób gleby do analiz makro- i mikroelementów? W jaki sposób pobierano próbki, z jakiej części doniczki, czy były to próby z pojedynczych doniczek czy zbiorcze z kilku doniczek? Jeżeli rzepak wraz z bakteriami tak znacząco wzbogaca glebę w fosfor, potas i azot, to czy możemy rozważać częściowe/całkowite zastąpienie nawożenia NPK upraw przed- lub poplonem z rzepaku i inokulacją odpowiednimi bakteriami czy grzybami?
 4. Obecność w glebie tworzyw, inokulacja gleby i rosnące w niej rośliny powodowały wzrost liczebności bakterii i grzybów. Czy Doktorantka zidentyfikowała jakie bakterie i grzyby namnażały się, czy były to głównie te którymi inokulowano glebę czy inne, naturalnie w niej występujące?

5. Czy zastosowanie do inokulacji gleby mieszaniny badanych szczepów bakteryjnych i grzybowych mogłoby spowodować jeszcze szybszą i efektywniejszą degradację tworzyw?
6. U bakterii odpowiedź ścisła jest reakcją fizjologiczną na niekorzystne warunki środowiska i objawiającą się wzmożoną syntezą i akumulacją nukleotydów o charakterze regulatorowym, zwanych alarmonami. Oddziaływanie alarmonów z polimerazą RNA wpływa na zmiany ekspresji genów i metabolizm komórki bakteryjnej. Wykazała Pani u bakterii *Serratia plymuthica* zwiększoną ekspresję genu odpowiedzi ścisłej *RelA* w obecności polilaktydu. Wiedząc, że odpowiedź ścisła jest włączona w regulowanie komunikacji między mikroorganizmami prowadząc np. do powstawania biofilmu bakterii na tworzywach sztucznych, czy możliwy jest podobny mechanizm komunikacji pomiędzy mikroorganizmami, a roślinami i dzięki temu tak dobry wzrost roślin w zanieczyszczonej tworzywami glebie?

Wniosek końcowy

Dysertacja została wykonana poprawnie pod względem metodycznym, a wartość jej wyników oceniam bardzo wysoko. Pani Katarzyna Janczak posiada umiejętności w zakresie stosowania nowoczesnych metod badawczych i interpretacji uzyskanych wyników. Styl, poprawność i przejrzystość rozprawy oraz poziom edytorski oceniam pozytywnie. W celu zrealizowania postawionych celów Autorka wykonała ogromną pracę przeprowadzając kolejne doświadczenia, żmudnego laboratoryjnego oznaczania parametrów folii poddanych biodegradacji i gleby, sprawdzając możliwość uprawy roślin na biomasę w glebach zanieczyszczonych tworzywami sztucznymi, a kończąc na analizach wyników. Uzyskane wyniki wnoszą nowe oryginalne wartości poznawcze z zakresu biodegradacji tworzyw polimerowych i bioremediacji gleb nimi zanieczyszczonych.

Praca doktorska mgr Katarzyny Janczak spełnia warunki stawiane pracom doktorskim określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 23.05.2019 r.

dr hab. Edyta Skrzypek

