



## **UNIWERSYTET ROLNICZY**

im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

**Katedra Mikrobiologii**

**30-059 Kraków, Al. Mickiewicza 24/28**

Tel.: +48 12 6624096 tel./fax: +48 12 6331356

Kraków, dnia 15 stycznia 2018 r.

### **Recenzja**

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Grażyny Kaczyńskiej**

**pt.:**

**„Remediacja gleby zanieczyszczonej produktami ropopochodnymi”**

Praca wykonana w Katedrze Mikrobiologii

na Wydziale Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Uniwersytetu

Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

Promotor: prof. dr hab. Jadwiga Wyszowska, prof. zw.

Promotor pomocniczy: dr Agata Borowik

Recenzja została przygotowana w odpowiedzi na pismo Pana Dziekana Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie prof. dr hab. Krzysztofa Młynarczyka, z dnia 01 grudnia 2017 roku, którym poinformowano mnie, że decyzją Rady Wydziału zostałam powołana na recenzentkę w/w pracy.

#### **Problematyka badawcza**

Przedstawiona do recenzji praca mgr inż. Grażyny Kaczyńskiej dotyczy niezwykle ważnego zagadnienia skażenia gleb związkami ropopochodnymi i eliminacji zanieczyszczeń, które są istotnym problemem środowiskowym. Intensywny rozwój przemysłu i stale rosnące zapotrzebowanie na produkty rafineryjne od lat przyczyniają się do zanieczyszczenia środowiska. W literaturze przedmiotu można znaleźć liczne publikacje dotyczące ochrony wód i gleb, a także propozycje metod umożliwiających usuwanie ze środowiska

zanieczyszczeń ropopochodnych, jednak problem nadal pozostaje nierozwiązany. Szacuje się, że do środowiska dostaje się od 0,1 do 0,25 % światowej produkcji ropy naftowej - zważywszy, że co roku sięga ona 5 mld Mg, są to ilości ogromne. Według różnych danych, zawartość produktów ropopochodnych w wielu miejscach (gleby, wody) przekracza limity środowiskowe i w samej Europie problem ten może dotyczyć ponad 40% zanieczyszczonych siedlisk.

Szczególnie zagrożonymi niekontrolowanym rozprzestrzenianiem się ropy naftowej i produktami ropopochodnymi są ekosystemy wodne i glebowe. Społeczeństwo i ekolodzy częściej zauważają zjawisko zanieczyszczenia wody, głównie wskutek incydentów morskich - uszkodzenia tankowców czy wycieków z platform wiertniczych, jednak rzadziej dostrzegane skażenie gleb stanowi równie istotny problem ekologiczny. Zanieczyszczenie gleby to nie tylko skutek katastrof podczas wydobywania ropy czy awarii w rafineriach, ale także wynik wzmożonego transportu samochodowego. Problem ten został jednak dostrzeżony, dlatego też dopuszczalne zawartości stężeń zanieczyszczeń w glebach zaliczanych do użytków rolnych zostały określone przez Rozporządzenie Ministra Środowiska z 2016 roku w sprawie sposobu prowadzenia oceny zanieczyszczenia powierzchni ziemi (Dz. U. z 2016 r. poz. 1395), a liczne badania, prowadzone na świecie, ukierunkowane są na poszukiwania bioindykatorów pozwalających na wiarygodną ocenę wpływu węglowodorów na stan środowiska naturalnego oraz pozyskiwanie i badanie mikroorganizmów zdolnych do rozkładu substancji ropopochodnych.

Produkty ropopochodne, poza ładunkiem substancji niebezpiecznych, są źródłem dużych ilości węgla, co przyczynia się do zachwiania równowagi stosunku C:N i może powodować istotne zmiany mikrobiota gleby poprzez modyfikację sukcesji mikrobiologicznej. Mikroorganizmy glebowe muszą przystosować się do zanieczyszczenia przed rozpoczęciem biodegradacji, która wymaga różnych grup drobnoustrojów, jednak w czasie aklimatyzacji do nowych warunków środowiskowych następują zmiany składu populacji wynikające głównie ze stopniowego wzrostu liczebności gatunków zdolnych do rozkładu zanieczyszczenia poprzez uruchomienie niezbędnych szlaków metabolicznych. Proces ten zawsze przebiega kosztem różnorodności gatunkowej – gdyż zaczynają dominować mikroorganizmy zdolne do degradacji związków ropopochodnych, które w niezanieczyszczonej glebie stanowią niewielki odsetek (0,1 – 0,2 %). To drobnoustroje i enzymy glebowe najczęściej pełnią rolę wysoce wrażliwych biosensorów – jednak, jak napisała Doktorantka, rozkład związków ropopochodnych stanowi dla mikroorganizmów niemałe wyzwanie metaboliczne i rzadko przebiega dzięki pracy jednego szczepu, zwykle bowiem wymaga kometabolizmu wielu gatunków. Współpraca populacji organizmów o różnym charakterze troficznym ułatwia degradację węglowodorów ropopochodnych a skład mikrobiologiczny biotopu określa

potencjał oczyszczania materiału glebowego podczas remediacji, dlatego biotechnologiczne metody w procesie oczyszczania gleb zyskują na popularności. Bioremediacja, metody zintegrowane, utlenianie chemiczne, ekstrakcja, ogrzewanie i remediacja elektrokinetyczna to najczęściej stosowane techniki oczyszczania gleb z węglowodorów ropopochodnych. Przyspieszenie procesów naturalnie przebiegających w ekosystemie jest najlepszą i najbardziej przyjazną środowisku alternatywą lub uzupełnieniem klasycznych metod jego oczyszczania i to właśnie na tym zagadnieniu skupiła się autorka pracy.

Mając na uwadze powyższe dane przedstawiona do recenzji praca wpisuje się w aktualną problematykę związaną z oceną presji i analizą skutków środowiskowych zanieczyszczenia ekosystemów produktami ropopochodnymi, wyznaczeniem biologicznych wskaźników (mikroorganizmy, aktywność enzymatyczna) zanieczyszczenia gleby oraz wypracowaniem nowoczesnych metod bioremediacji gleb skażonych.

Zważywszy na szeroki zakres analiz i ich różnorodność, szczególnie doceniam duży nakład pracy Doktorantki jaki został włożony w realizację badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy oraz dokumentację i analizę wyników. Pozytywnie oceniam opracowanie, które mieści się w dyscyplinie ochrona i kształtowanie środowiska.

### **Ocena pracy pod względem formalnym i strukturalnym**

Przedstawiona do recenzji praca została przygotowana w formie opracowania w sposób typowy dla doktorskich prac eksperymentalnych i obejmuje 189 stron maszynopisu, w tym 163 strony tekstu zasadniczego podzielonego na siedem rozdziałów z podrozdziałami systematyzującymi dane teoretyczne zawarte w przeglądzie literatury, informacje na temat zastosowanych metod badawczych, analizę wyników z badań własnych autorki, dyskusję, podsumowanie i wnioski oraz kolejne 26 stron na których znajdują się informacje dotyczące cytowanej literatury, spisy tabel i rysunków oraz streszczenia w języku polskim i angielskim (dodatkowe 5 rozdziałów).

Pod względem układu praca zasadniczo przygotowana jest poprawnie i logicznie, a rozdziały zostały przedstawione we właściwej kolejności – niemniej jednak uważam, że cel pracy jest na tyle istotnym elementem rozprawy, że zasługuje na to, aby go wyraźnie wyodrębnić jako rozdział, a nie tylko zamieścić jako część wstępu; natomiast zbędne było - w moim mniemaniu – wyodrębnienie podrozdziału 8.1.

Lista cytowanych prac jest bardzo długa i liczy 372 pozycje. Wykorzystana w przygotowaniu opracowania literatura obejmuje starannie dobrane teksty źródłowe - 353 publikacje naukowe oraz 19 innych pozycji piśmiennictwa w tym normy, rozporządzenia, ustawy, karty charakterystyk, raporty i nieliczne odsyłacze do stron internetowych. Zgromadzona literatura to głównie najnowsze prace obcojęzyczne oraz pozycje starsze, które

niezbędne były dla prawidłowego przedstawienia analizowanego zagadnienia, zarówno od strony teoretycznej jak i praktycznej. Praca przygotowana jest ciekawie i spójnie a zgromadzona bibliografia została zacytowana poprawnie.

Wyniki badań przeprowadzonych w trakcie realizacji pracy autorka zestawiała w 30 tabelach i przedstawiła graficznie na aż 162 rysunkach.

Pod względem formalnym opracowanie nie wzbudza zastrzeżeń jest przejrzyste i napisane w sposób poprawny językowo – nieliczne błędy stylistyczne i edytorskie nie obniżają wartości opracowania.

Oprawa graficzna pracy jest estetyczna i świadczy o staranności Doktorantki.

### **Ocena pracy pod względem metodycznym**

W ramach części eksperymentalnej, przedstawionej do recenzji pracy, Doktorantka przygotowała obszerne doświadczenie i wykonała szereg analiz mikrobiologicznych (w tym molekularnych) oraz biochemicznych do których, w mojej ocenie, wykorzystwała poprawne techniki badawcze. Badania zostały zaplanowane logicznie a doświadczenie ma prawidłowy układ. Metodyka została wystarczająco szczegółowo opisana i opatrzona stosownymi odsyłaczami do tekstów źródłowych. W przypadku tak obszernego i złożonego doświadczenia warto było rozważyć przedstawienie go w postaci schematu, który ułatwiłby zrozumienie założeń i przebieg eksperymentu.

Szeroko zakrojone badania laboratoryjne wymagały od doktorantki dużego nakładu pracy, konsekwencji w działaniu i systematyczności, bowiem tego typu analizy są bardzo czasochłonne i wymagają ogromnego zaangażowania badacza.

Zgromadzone wyniki badań, wykonanych w odpowiedniej liczbie powtórzeń, zostały opracowane statystycznie i przedstawione w przejrzysty sposób w postaci 30 tabel i bardzo licznych wykresów (131 w rozdziale Wyniki i kolejnych 31 w rozdziale Podsumowanie).

Mam jednak pewne spostrzeżenia, dotyczące części metodycznej, wymagające wyjaśnienia. W tabeli 1 zamieszczone zostały wybrane właściwości fizykochemiczne gleby wykorzystanej w badaniach – czy autorka sama wykonała analizy? – jeśli tak to brakuje metodyki, jeśli nie to uważam, że należało podać źródło pochodzenia danych.

Co zdecydowało o wyborze rodzaju gleby do badań? Czy nie lepiej było wybrać do doświadczenia glebę o odczynie obojętnym?

Co zdecydowało o wyborze oznaczanych enzymów?

Zwróciłam również uwagę na to, że na stronie 36 autorka podaje, że mikrobiologiczne analizy ilościowe wykonano „metodą płytkową” – chociaż nie jest to niepoprawne, proponuję zmianę na „metodą seryjnych rozcieńczeń” (*ang.* serial dilution method), bo takiej nazwy metody używa się w większości prac.

## Ocena merytoryczna pracy

Teoretyczne podstawy związane z celami badawczymi autorka przedstawiła w ciekawie i spójnie przygotowanym przeglądzie literatury. W ramach tego rozdziału Dyplomantka dokonała szczegółowej analizy tekstów źródłowych bezpośrednio związanych z tematyką realizowanych badań, charakteryzując produkty ropopochodne wykorzystane w badaniach oraz omawiając ich los w środowisku glebowym i podkreślając rolę drobnoustrojów w ich degradacji. Opisała problemy dotyczące oddziaływania biodiesla, oleju napędowego i opałowego oraz benzyny na drobnoustroje glebowe i enzymy decydujące o aktywności biochemicznej gleb. Autorka zwróciła również uwagę na problem remediacji gleb poddanych presji produktów ropopochodnych i technologie środowiskowe stosowane w bioremediacji *in situ*.

Autorka pracy postawiła sobie ambitny cel określenia wskaźników aktywności mikrobiologicznej i biochemicznej gleby zanieczyszczonej biodieslem, olejem napędowym, olejem opałowym i benzyną bezołowiową 98; identyfikacji bakterii degradujących produkty ropopochodne oraz określenia roli mocznika i kompostu z pomiotu indyczego i trocin w przywracaniu równowagi biologicznej gleby zanieczyszczonej produktami ropopochodnymi. Zamierzony cel osiągnęła przygotowując przemyślane doświadczenie, które posłużyło licznym analizom biochemicznym, mikrobiologicznym i molekularnym.

Na wyróżnienie zasługuje bardzo duża ilość zebranych przez Doktorantkę wyników w rozdziale 4., co w połączeniu ze staranną analizą statystyczną i graficznym ich opracowaniem świadczy o ogromie wykonanej przez nią pracy. W ramach przeprowadzonych badań Dyplomantka dokonała mikrobiologicznej analizy ilościowej i jakościowej gleb skażonych – oznaczając liczebność dziewięciu grup drobnoustrojów (bakterie organotroficzne, proteolityczne, amonifikacyjne, nityfikacyjne I i II fazy, amylolityczne, bakterie z rodzaju *Azotobacter*, promieniowce i grzyby), izolując i oznaczając metodami molekularnymi (16s RNA) przynależność systematyczną bakterii dominujących w glebach skażonych – najprawdopodobniej o dużym potencjale do rozkładu związków ropopochodnych. Doktorantka wykonała również oznaczenia aktywności sześciu enzymów (katalazy, fosfatazy kwaśnej i alkalicznej, ureazy, arylosulfatazy,  $\beta$ -glukozydazy) w kolejnych 180 dniach eksperymentu prowadzonego z wykorzystaniem dodatku kompostu i mocznika jako substancji biostymulujących rozkład biodiesla, oleju napędowego i opałowego oraz benzyny. W tym miejscu nasuwa mi się pytanie, na które oczekuję odpowiedzi podczas obrony –

Dlaczego nie oznaczano aktywności dehydrogenaz, które są wymieniane jako jeden z podstawowych wskaźników wykorzystywanych w ocenie aktywności biologicznej gleb?

Uzyskane wyniki badań zostały poddane dyskusji w rozdziale 6, w którym na tle literatury omówione zostały zmiany zarówno w składzie ilościowym jak i jakościowym populacji oznaczanych mikroorganizmów, a także scharakteryzowane zostały wyizolowane bakterie. Ten rozdział zawiera także informacje dotyczące enzymów wykorzystywanych jako wskaźniki i zmian ich aktywności w badanym materiale w odpowiedzi na zanieczyszczenie związkami ropopochodnymi i addycję kompostu i mocznika.

Wnikliwą analizę i syntetyczne przedstawienie wyników znajdziemy w Podsumowaniu, chociaż nie jest to często praktykowane, rozdział zawiera po prostu wyliczone najważniejsze wyniki, a szczegółowe wnioski zostały sformułowane w rozdziale 7.

Na podstawie wykonanych badań autorka wysunęła 12 wniosków trafnie reasumujących uzyskane wyniki. Autorka w swoich spostrzeżeniach końcowych zwróciła uwagę na fakt, że reakcja drobnoustrojów i enzymów na różne rodzaje zanieczyszczeń była zróżnicowana, jednak wszystkie badane związki ropopochodne destabilizowały homeostazę gleby a zakłócenia w równowadze mikrobiologicznej i biochemicznej utrzymywały się w całym okresie badań. Autorka zaobserwowała większe oddziaływanie różnych rodzajów produktów ropopochodnych na enzymy niż na drobnoustroje glebowe. Wyizolowane z zanieczyszczonej gleby bakterie należały do phylum *α-Proteobacteria*, *γ-Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* i do rodzajów/gatunków, które między innymi odpowiedzialne są za degradację produktów ropopochodnych w glebach. Dyplomantka dostrzegła również skuteczność zabiegów wzbogacania zanieczyszczonej gleby kompostem i mocznikiem, które stymulowały namnażanie drobnoustrojów i wzmacniały aktywność enzymów glebowych, przez co degradacja produktów ropopochodnych mogła zachodzić intensywniej. Zauważyła, że kompost, ze względu na złożony skład chemiczny, okazał się lepszym biostymulatorem dla drobnoustrojów niż mocznik.

Mając na uwadze informacje zawarte w poszczególnych rozdziałach i podrozdziałach praca może stanowić istotną pozycję w literaturze związanej z wpływem zanieczyszczeń ropopochodnych na aktywność mikrobiologiczną i enzymatyczną gleb, a także remediacją gleb z wykorzystaniem biostymulantów.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam również drobne uwagi dotyczące pracy - mając jednocześnie nadzieję, że posłużą lepszemu przygotowaniu zawartych w niej wyników do druku:

- 1) Strona 5 – jest: „...zbadanie wpływu...” powinno być „...zbadanie ich wpływu...”;
- 2) Strona 7 – jest: „...znalazło się 202 substancje...” powinno być „...znalazły się 202 substancje ...”;
- 3) Strona 9 – Podane w pierwszym zdaniu na stronie wartości 0,2 i 0,16 mln Mg·d<sup>-1</sup> to moim zdaniem spadek dziennego zapotrzebowania na ropę w latach 2015 i 2016 a nie dzienne zapotrzebowanie, co sugeruje jego treść – gdyż to kształtuje się na poziomie 13 mln Mg·d<sup>-1</sup>; - jest: „...wykorzystanie biopaliw szybko rosła...” - powinno być: „...wykorzystanie biopaliw szybko rosło...”;
- 4) Strona 18 – jest: „...obserwowano ich zwiększenie...” - powinno być „...obserwowano zwiększenie ich liczebności...”;
- 5) Strona 19 – jest: „...*Arthrobacter*..., *Pseudomonas*...” - powinno być: „...*Arthrobacter* sp. , *Pseudomonas* sp. ...”;
- 6) Strona 20 – jest: „...pod kontem...” - powinno być „...pod kątem...”;
- 7) Strona 21 – jest: „...proces biokatalizy...zależna jest...” - powinno być „...proces biokatalizy...zależny jest...”;
- 8) Strona 25 – jest: „...mogą wywoływać wzrost nienasyconych kwasów tłuszczowych...” - powinno być „...mogą wywoływać wzrost zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych...”;
- 9) Strona 35 – jest: „...biostymulujący...” - powinno być „...biostymulujący...”;
- 10) Strona 99 – jest: „...pozwoliła na określenie poszczególnych szczepów drobnoustrojów...” - proponuję „...pozwoliła na identyfikację poszczególnych szczepów drobnoustrojów ...” lub „...pozwoliła na określenie przynależności systematycznej poszczególnych szczepów drobnoustrojów ...”;
- 11) Strona 140 – jest: „...biodiesel i olej napędowy przyczynił się do...” - powinno być „...biodiesel i olej napędowy przyczyniły się do ...”, sformułowanie „...kolonizują się i rosną...” nie brzmi zbyt dobrze;
- 12) Strona 144 – jest: „...enzymem, obecnym we wszystkich bakteriach...” – proponuję „...enzymem, obecnym u wszystkich bakterii ...”;
- 13) Strona 147 – jest: „Długość czasu inkubacji nie sprzyjał aktywności...” - powinno być „Długość czasu inkubacji nie sprzyjała aktywności...”;
- 14) Strona 150 – jest: „...dodatnio korelował z ureazą...” - powinno być „...dodatnio korelował z aktywnością (lub ilością) ureazy...”; jest „Wskaźnik biostymulacji IF<sub>b</sub>

rysował krzywą zmian...” – powinno być „Wskaźnik biostymulacji IF<sub>6</sub> pozwolił na wykreślenie (wrysowanie) krzywej zmian...”

15) Strona 151 – jest: „...rozkładu toluen...” - powinno być „...rozkładu toluenu...”, jest: „...miał rozbieżny udział...” – może lepiej „...miał zróżnicowany udział...”;

16) Strona 156 – jest: „...zastosowanie nawożenie...” - powinno być „...zastosowane nawożenie...”;

17) Strona 163 – we wniosku 10 sformułowanie „Oczywiście kompost...” - lepiej zmienić po prostu na „Kompost...”;

18) Strona 189 – na początku streszczenia w języku angielskim proponuję zamiast „The objective of the study...” użyć „The aim of the study...”, a w ostatnim zdaniu zamiast „...for degrading petroleum...” „...for degradation of petroleum...”.

Powyższe uwagi mają głównie naturę korekty błędów edycyjnych i nie umniejszają mojej ogólnej wysokiej oceny rozprawy doktorskiej.

### **Wniosek końcowy**

Podsumowując recenzję stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa naukowa pt. „Remediacja gleby zanieczyszczonej produktami ropopochodnymi” przygotowana przez mgr inż. Grażynę Kaczyńską stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wskazuje, że autorka posiada teoretyczną wiedzę z zakresu nauk rolniczych, zdolna jest do planowania eksperymentów, opanowała techniki laboratoryjne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy badawczej w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie ochrona i kształtowanie środowiska, spełniając tym samym wymagania stawiane pracom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami).

W związku z powyższym wnioskuję do członków Rady Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie mgr inż. Grażyny Kaczyńskiej do dalszych etapów postępowania przewodu doktorskiego.

Dr hab. inż. Maria J. Chmiel



.....