

Prof. dr hab. inż. Sławomir Ciesielski, prof. zw.  
Katedra Biotechnologii w Ochronie Środowiska  
Instytut Inżynierii i Ochrony Środowiska  
Wydział Geoinżynierii  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Justyny Michalskiej pt.: „Wpływ bioaugmentacji osadu czynnego wyselekcjonowanymi szczepami bakterii oraz ich konsorcjum na efektywność procesu oczyszczania zafenolowanych odcieków ze stawu Kalina”

### 1. Podstawa opracowania

Podstawą formalną opracowania recenzji jest pismo prof. dra hab. Piotra Świątka, Prodziekana ds. Nauki i Współpracy z Zagranicą Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, datowane na dzień 18.05.2020 roku. Przedmiotem recenzji jest rozprawa doktorska mgr Justyny Michalskiej pt.: "Wpływ bioaugmentacji osadu czynnego wyselekcjonowanymi szczepami bakterii oraz ich konsorcjum na efektywność procesu oczyszczania zafenolowanych odcieków ze stawu Kalina", która została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Agnieszki Mrozik.

### 2. Celowość podjętej tematyki badawczej

Zrozumienie mechanizmów i dynamiki przemian zanieczyszczeń w ekosystemach naturalnych i antropogenicznych jest ważne nie tylko z poznawczego punktu widzenia, ale staje się niezbędnym elementem aktywnej ochrony środowiska. Szczególnie ważne jest opracowanie metod umożliwiających rekultywację obszarów zanieczyszczonych w wyniku działalności przemysłowej człowieka. W ostatnich latach coraz większą uwagę zwraca się na biologiczne metody rewitalizacji terenów uprzemysłowionych. Wykorzystywane do tej pory metody bioremediacji nie zawsze przynoszą spodziewane efekty dlatego też cenne są inicjatywy

zmierzające do ich optymalizacji. Tematyka pracy doktorskiej doskonale wpisuje się więc w aktualne trendy badawcze w zakresie szeroko rozumianej bioremediacji środowiska. Mimo tego, że prace badawcze prowadzone były na przykładzie jednego zbiornika wodnego to otrzymane wyniki można wykorzystać do rozwiązywania problemów ekologicznych dotyczących akwenów o podobnym charakterze zanieczyszczenia. W świetle tych informacji, postawiony w recenzowanej pracy doktorskiej Pani mgr Justyny Michalskiej problem badawczy jest celowy i uzasadniony merytorycznie.

Głównym celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu bioaugmentacji osadu czynnego obciążonego odciekami z osadów dennych stawu Kalina w Świętochłowicach z wykorzystaniem wyselekcjonowanych szczepów bakterii oraz ich konsorcjum na efektywność usuwania zanieczyszczeń w ściekach. Dodatkowym celem była ocena wpływu bakterii inokulowanych do osadu na jego kondycję oraz aktywność enzymatyczną, żywą biomasę i potencjał funkcjonalny zespołów mikroorganizmów autochtonicznych tworzących osad czynny.

### 3. Charakterystyka rozprawy doktorskiej

Rozprawę doktorską Pani mgr Michalskiej stanowi pięć publikacji naukowych, które poprzedzone są *Autoreferatem rozprawy*. Dwie publikacje mają charakter prac przeglądowych i zostały opublikowane w języku polskim w czasopismach *Postępy Mikrobiologii* oraz *Ochrona Środowiska*. Pozostałe trzy publikacje to oryginalne prace naukowe mające charakter zespołowy i opublikowane zostały w języku angielskim w czasopiśmie *Water*. We wszystkich pracach Pani mgr Michalska jest pierwszym autorem, a Jej udział w tworzeniu tych prac polegał na współpracowaniu koncepcji badań, poborze prób, prowadzeniu prac eksperymentalnych, interpretacji uzyskanych wyników oraz przygotowaniu prac do druku.

*Autoreferat rozprawy* jest pierwszym rozdziałem rozprawy i składa się z pięciu podrozdziałów. Pierwszy podrozdział to *Wprowadzenie*, które przedstawia problematykę zanieczyszczenia terenów uprzemysłowionych oraz możliwości wykorzystania technologii osadu czynnego, bioaugmentacji osadu czynnego oraz selekcji mikroorganizmów na potrzeby bioaugmentacji. Kolejnym podrozdziałem jest *Cel pracy doktorskiej*, który zawiera obok celu pracy opis ośmiu zadań badawczych prowadzących do jego osiągnięcia. W dalszej kolejności Autorka umieściła podrozdział *Materiał i metody*. W podrozdziale tym przedstawiono miejsce poboru prób oraz szczegółowo opisano zastosowaną metodykę pracy. Metodykę można uznać

za niezwykle rozbudowaną ponieważ składają się na nią metody chemiczne, mikrobiologiczne oraz technologiczne. Dowodzi to szerokiego warsztatu badawczego Doktorantki. Niedosyt budzi jednakże opis miejsca poboru prób. Badany staw Autorka opisała już wcześniej we *Wprowadzeniu*, jednakże nadal opis ten uznaję za niewystarczający. Zabrakło między innymi opisu parametrów zbiornika wodnego takich jak powierzchnia, głębokość, termika. Ważna dla zrozumienia całego problemu jest również dokładniejsza historia zanieczyszczenia stawu. Brakuje również informacji, czy staw ten poddawany był wcześniej rekultywacji. Mam wątpliwości co do prawidłowego nazewnictwa pobieranych i badanych próbek. Autorka określa je jako „odcieki” którymi, moim zdaniem, były zanim dostały się do stawu. Pobierane próbki były raczej wodami osadowymi lub śród-osadowymi.

Następnym rozdziałem rozprawy są *Wyniki i dyskusja*. Rozdział ten został podzielony na trzy części opisując we właściwej kolejności (1) wody osadowe pobrane ze stawu Kalina oraz możliwość ich oczyszczania metodą osadu czynnego, (2) szczepy bakteryjne pod kątem ich przydatności do bioaugmentacji osadu czynnego i (3) efektywność bioaugmentacji osadu czynnego wybranymi szczepami bakteryjnymi. Omawiane części odnoszą się do poszczególnych publikacji badawczych tworzących niniejszą rozprawę doktorską. Chociaż rozdział ten zawiera głównie wyniki, w niewielkim stopniu dyskutowane przez Doktorantkę, to uważam że został on poprawnie przygotowany, przedstawiając czytelnikowi w sposób syntetyczny uzyskane wyniki. Ostatnim podrozdziałem *Autoreferatu rozprawy* jest *Spis literatury*, na który składa się 157 pozycji, z których znakomita większość została opublikowana w czasopismach o szerokim wpływie oddziaływania.

Dalszą część rozprawy doktorskiej stanowią publikacje naukowe. Dwie pierwsze pozycje to prace przeglądowe dotyczące bioaugmentacji w procesach oczyszczania ścieków i utylizacji osadów. Dołączanie prac przeglądowych do zbioru prac oryginalnych tworzących rozprawę doktorską jest szeroko stosowaną praktyką i moim zdaniem właściwą. Zazwyczaj jest to jednak jedna pozycja. Obydwie prace przeglądowe wchodzące w skład niniejszej rozprawy doktorskiej przedstawiają zbliżone a czasami identyczne treści. Uważam, że rozprawa doktorska Pani Justyny Michalskiej nie straciłaby, gdyby zamieszczona była tylko praca opublikowana w *Postęпах Mikrobiologii*. Praca ta lepiej koresponduje z publikacjami oryginalnymi tworzącymi rozprawę doktorską.

Pierwsza z prac oryginalnych - *Impact of the biological cotreatment of the Kalina pond leachate on laboratory sequencing batch reactor operation and activated sludge quality*, ukazała się w 2019 roku w czasopiśmie *Water* (IF=2,524). Celem pracy było zbadanie wpływu

wód osadowych pochodzących ze stawu Kalina na proces oczyszczania ścieków metodą osadu czynnego w oczyszczalni ścieków "Klimzowiec" i w reaktorze laboratoryjnym typu SBR. Szczegółowymi celami pracy było (1) scharakteryzowanie i określenie toksyczności wód osadowych na mikroorganizmy osadu czynnego, (2) określenie zmian parametrów technologicznych w reaktorze typu SBR, (3) analiza potencjału funkcjonalnego i zróżnicowania zespołów mikroorganizmów, (4) zbadanie struktury kłaczków osadu czynnego, (5) określenie zależności między czynnikami biologicznymi a fizyko-chemicznymi. Według autorów publikacji szczególną uwagę poświęcono wykorzystaniu analizy kwasów tłuszczowych do określenia zmian w strukturze zespołu mikroorganizmów po dodaniu wód osadowych ze stawu Kalina. O ile analiza kwasów tłuszczowych może dostarczyć unikalnych informacji o metabolizmie zespołów mikroorganizmów o tyle znacznie lepszym narzędziem do określenia zmian w strukturze tych zespołów są metody metagenomiczne.

Przeprowadzone badania wykazały, że dodatek wód osadowych w stężeniu poniżej 3,45% nie miał wpływu na wzrost mikroorganizmów osadu czynnego. Natomiast ekspozycja tych mikroorganizmów na stężenie wód osadowych w stężeniu powyżej 11,26 % spowodowała zahamowanie ich wzrostu. Dodatkowo, wprowadzenie wód osadowych przyczyniło się do obniżenia efektywności usuwania zanieczyszczeń, co było wyrażone spadkiem wartości ChZT. Co więcej zaobserwowano spadek aktywności mikrobiologicznej, potencjału funkcjonalnego oraz różnorodności mikroorganizmów. Dodatkowego wyjaśnienia może wymagać podany w publikacji sposób obliczania podobieństwa między strukturą zespołów mikroorganizmów. Zapewne do jej obliczenia wykorzystano jedynie metodę „weighted stack” opisaną przez Son'a i Hall'a (2008) a nie wskaźnik bioróżnorodności Shannona.

Kolejna praca - *Selecting bacteria candidates for the bioaugmentation of activated sludge to improve the aerobic treatment of landfill leachate* została opublikowana w 2020 roku. Celem pracy była charakterystyka wybranych szczepów bakteryjnych w celu wykorzystania ich do bioaugmentacji osadu czynnego obciążonego wodami osadowymi ze stawu Kalina. W pracy wykorzystano zarówno szczepy znane już z ich zdolności biodegradacyjnych jak i te, które zostały wyizolowane ze środowiska naturalnego a ich potencjał metaboliczny nie był wcześniej testowany. Wielu autorów uważa, że prawdopodobieństwo sukcesu bioaugmentacji można zwiększyć poprzez izolację szczepów natywnych dla zanieczyszczonego środowiska i po namnożeniu ich w warunkach laboratoryjnych wykorzystanie do bioaugmentacji. W ocenianej rozprawie doktorskiej nie znalazłem informacji wskazujących na próbę izolacji bakterii charakteryzujących się zdolnością rozkładu substancji fenolowych z wód osadowych lub osadu

ze stawu Kalina. Przeprowadzone badania wykazały, że dwa z dziesięciu analizowanych szczepów posiadały niezbędne cechy do bioaugmentacji osadu czynnego obciążonego wodami osadowymi ze stawu Kalina. Szczepy OR45A i KB3 należące do gatunku *Pseudomonas putida*, posiadają wysoki potencjał metaboliczny i wspomagały proces degradacji zanieczyszczeń w osadzie czynnym. Genomy obydwu szczepów zostały poddane reakcji sekwencjonowania DNA, a następnie analizie bioinformatycznej. Pozwoliło to potwierdzić, że dysponują one genami umożliwiającym rozkład związków aromatycznych. Rozprawę doktorską wzbogaciłaby analiza różnicowa genów zaangażowanych w rozkład związków aromatycznych u obydwu szczepów. Można byłoby wtedy skorelować obserwowane różnice w aktywności badanych szczepów z obecnością w ich genomach poszczególnych genów lub ich wariantów.

Ostatnia z omawianych prac zatytułowana jest *Analysis of the bioaugmentation potential of Pseudomonas putida OR45a and Pseudomonas putida KB3 in the sequencing batch reactors fed with the phenolic landfill leachate*. Publikacja ta, ukazała się w 2020 roku podobnie jak dwie poprzednie w czasopiśmie *Water*. Celem pracy było określenie efektywności oczyszczania ścieków w osadzie czynnym bioaugmentowanym szczepami OR45A i KB3 należącymi do gatunku *Pseudomonas putida* oraz ich konsorcjum. Osad czynny obciążony był wodami osadowymi ze stawu Kalina. Stwierdzono zwiększoną efektywność usuwania związków fenolowych w osadzie czynnym bioaugmentowanym obydwoma szczepami oraz ich mieszaniną. Co istotne, zwiększona skuteczność usuwania związków fenolowych skorelowana była pozytywnie ze skutecznością usuwania związków organicznych wyrażonych jako ChZT oraz azotu amonowego. Analiza parametrów operacyjnych, wskaźników kondycji osadu czynnego i potencjału funkcjonalnego mikroorganizmów osadu czynnego obciążonego wodami ze stawu Kalina wskazały na silną zależność między bioaugmentacją a wysoką efektywnością procesu oczyszczania ścieków. Interesującym aspektem jest zastosowanie konsorcjum składającego się z obydwu badanych szczepów. Zgodnie z uzyskanymi wynikami efektywność usuwania zanieczyszczeń w wyniku dodania konsorcjum była na takim samym poziomie jak w przypadku bioaugmentacji *P. putida* OR45a (90%) mimo tego, że efektywność osiągnięta poprzez wprowadzenie *P. putida* KB3 wyniosła 95%. Szkoda, że Doktorantka nie pokusiła się o wytłumaczenie tego wyniku. Należałoby się też zastanowić czy mieszaninę dwóch szczepów *P. putida* można określać jako konsorcjum jeśli nie mamy dowodów, że szczepy te uzupełniają się funkcjonalnie posiadając różne szlaki metaboliczne. Generalnie, wyniki tej pracy są zarówno interesujące jak i ważne gdyż jednoznacznie udowadniają, że bioaugmentacja jest zabiegiem przynoszącym ewidentną poprawę efektywności procesu

osadu czynnego w zakresie usuwania związków fenolowych. Opracowana technologia może być z powodzeniem wykorzystywana w szerszej skali.

Kolejnym elementem pracy jest *Podsumowanie* składające się z dziewięciu punktów, z których większość można określić jako wnioski. W następnej kolejności znajduje się *Streszczenie* przygotowane w języku polskim i angielskim. Ostatnim elementem pracy są *Oświadczenia* Doktorantki i współautorów publikacji o wkładzie, jaki został przez nich włożony w powstanie każdej publikacji.

#### 4. Ocena końcowa pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska nie budzi żadnych zastrzeżeń. Uzyskane wyniki stanowią ważny wkład w rozwój biotechnologii środowiskowej. Wymiernym efektem, potwierdzającym wysoką jakość badań przeprowadzonych przez Panią mgr Michalską, jest opublikowanie prac w czasopismach charakteryzujących się dużą rozpoznawalnością. Należy podkreślić, że Doktorantka podjęła się ambitnego zadania o charakterze interdyscyplinarnym, co wiązało się z koniecznością współpracy z innymi naukowcami. Doktorantka wykazała się umiejętnością formowania i rozwiązania aktualnego problemu naukowego, uzyskała interesujące i ważne wyniki oraz udowodniła dobrą znajomość tematyki badawczej. Doktorantka osiągnęła zamierzone cele, dając dowód umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Rozprawa jest oryginalnym dorobkiem Doktorantki i spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim. Wyniki zdobyte podczas realizacji pracy doktorskiej nie tylko pogłębiają wiedzę na temat mikrobiologicznych metod remediacji terenów uprzemysłowionych, ale również mogą pomóc w opracowaniu technologii stosowanych do rewitalizacji innych terenów zanieczyszczonych w wyniku rozwoju przemysłu. Natomiast, wszystkie zawarte w recenzji krytyczne uwagi nie umniejszają ogólnej wartości pracy, a jej całość pozwala na pozytywną ocenę założeń rozprawy, jej wartości merytorycznej, uzyskanych wyników i wyciągniętych wniosków.

#### 5. Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że recenzowana praca doktorska Pani mgr Justyny Michalskiej pt.: " Wpływ bioaugmentacji osadu czynnego wyselekcjonowanymi szczepami bakterii oraz ich konsorcjum na efektywność procesu oczyszczania zafenolowanych odcieków

ze stawu Kalina” stanowi istotny wkład w poszerzenie wiedzy w zakresie wykorzystania metod mikrobiologicznych do remediacji środowiska naturalnego.

Przedłożona przez Autorkę rozprawa doktorska świadczy o Jej naukowej dojrzałości, dużej praktycznej znajomości metod badawczych oraz obszernej wiedzy teoretycznej związanej z podjętym zagadnieniem. Praca doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz.U. z 2017 r., poz. 1789), zgodnie z art. 179 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. „Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669)”. W związku z powyższym przedstawiam Radzie Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska wnioski o dopuszczenie Pani mgr Justyny Michalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na uzyskanie niezwykle cennych wyników oraz wysoką jakość przeprowadzonych badań wnioskuję o nagrodzenie Pani mgr Justyny Michalskiej stosownym wyróżnieniem.

Olsztyn, 30.06.2020

Stanisław Olszowski