

Katowice, dn. 2 czerwca 2025 r.

dr hab. Tomasz Płociniczak
profesor Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Śląski w Katowicach
e-mail: tomasz.plociniczak@us.edu.pl
tel. +48667125783

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Mariusza Wróbla
pt. Biodegradacja mikroplastików przez mikroorganizmy pochodzące ze środowiska
naturalnego i antropogenicznego

Mgr Mariusz Wróbel do recenzji przedstawił rozprawę doktorską zatytułowaną Biodegradacja mikroplastików przez mikroorganizmy pochodzące ze środowiska naturalnego i antropogenicznego, przygotowaną pod kierunkiem promotora dr hab. Tomasz Kowalkowskiego, prof. UMK oraz promotorki pomocniczej dr Soni Szymańskiej. Praca doktorska ma postać opracowania hybrydowego, tj. przedstawiono w niej wyniki opublikowane do tej pory w dwóch pracach naukowych, które to prace są integralną częścią przedstawionej do recenzji dysertacji. Doktorant szczegółowo opisał również wyniki, które zapewne będą podstawą trzeciej publikacji, a które dotyczą struktury i różnorodności mykobiomów badanych środowisk, izolacji i identyfikacji hodowalnych szczepów grzybów, a także testów degradacyjnych wybranych materiałów polimerowych w hodowlach wzbogacających.

Zamieszczone w pracy doktorskiej wyniki opublikowano do tej pory w postaci dwóch manuskryptów:

1. Wróbel, M., Szymańska, S., Kowalkowski, T., & Hryniewicz, K. (2023). Selection of microorganisms capable of polyethylene (PE) and polypropylene (PP) degradation. Microbiological Research, 67, 127251; DOI: j.micres.2022.127251 (IF=6,1; pkt MNiSW=100)



2. Wróbel, M., Deja-Sikora, E., Hrynkiewicz, K., Kowalkowski, T., & Szymańska, S. (2024). Microbial allies in plastic degradation: specific bacterial genera as universal plastic-degraders in various environments. *Chemosphere*, 363, 142933; DOI: j.chemosphere.2024.142933 (IF= brak; pkt MNiSW=140)

Suma punktów ministerialnych dla tych dwóch opracowań wynosi 240, a współczynnik wpływu zgodnie z rokiem wydania wynosi 6,1. Niestety, w 2024 roku czasopismo *Chemosphere* nie było indeksowane w bazie Journal Citation Report. Nie umniejsza to w żaden sposób wartości pracy numer 2, a jest raczej wynikiem sytuacji na którą Doktorant nie miał wpływu. Niezależnie od wskaźników naukometrycznych oba czasopisma, tj. *Microbiological Research* oraz *Chemosphere* są uznanymi w świecie naukowym, a opublikowanie wyników na ich łamach jest niewątpliwym sukcesem. Przykładowo w czasopiśmie *Microbiological Research* publikowane jest jedynie 6% nadesłanych manuskryptów.

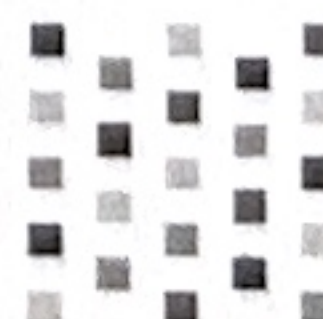
W obu pracach Doktorant wskazany jest jako pierwszy autor odpowiedzialny za przeprowadzenie badań, analizę i opracowanie wyników, a także przygotowanie pierwszych wersji manuskryptów. Bardzo proszę o wyszczególnienie wkładu Doktoranta w otrzymanie nieopublikowanych do tej pory wyników. Mgr Mariusz Wróbel uczestniczył również czynnie w konferencjach naukowych, a jedna z prezentacji, które wygłosił została nagrodzona podczas Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej „Metagenomy różnych środowisk” w 2023 roku.

Ocena pracy doktorskiej

W czasach stale rosnącej produkcji i wykorzystywania plastików, a także wzrastającej świadomości społecznej związanej z zagrożeniami powodowanymi obecnością mikro(nano)plastików (MNPs) w środowisku, dobór tematu badawczego należy uznać za bardzo trafny i uzasadniony. Opisane w pracy doktorskiej wyniki badań są bardzo przydatne do opracowania skutecznych metod eliminacji mikroplastików (MPs) ze środowiska. Podjęte przez Doktoranta działania zmierzające do pozyskania szczepów bakterii i grzybów o zdolnościach do degradacji wybranych materiałów polimerowych są szczególnie ważne także z aplikacyjnego punktu widzenia.

Miej

Strona 2



Tekst **wstępu** do pracy jest syntetycznym opisem zagrożeń powodowanych przez obecność MNPs w środowisku, a także wprowadzeniem czytelnika w tematykę dysertacji i prezentuje niezbędne informacje ułatwiające interpretację uzyskanych przez Doktoranta wyników. **Cele** pracy zostały sformułowane precyzyjnie, a zaproponowane **hipotezy** badawcze są ciekawe i ambitne.

Opis metodyczny przeprowadzonych doświadczeń pozwala na ich powtórzenie przez innych badaczy, zaproponowana metodyka jest adekwatna do realizacji postawionych celów, a przygotowanie odpowiednich układów kontrolnych sprawia, że uzyskane wyniki mają wysoką wartość naukową. Uzyskane wyniki poddano również analizie statystycznej, co jest niezbędne do prawidłowego wnioskowania. Realizując pracę doktorską Mgr Mariusz Wróbel wykorzystywał tradycyjne metody hodowlane, a także techniki molekularne (izolacja i sekwencjonowanie DNA) oraz zaawansowane metody oceny efektywności degradacyjnej takie jak mikroskopia skaningowa (SEM) oraz spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR).

Ponieważ większość uzyskanych wyników jest już opublikowana, a więc przeszła wieloetapowy proces weryfikacji i recenzji przez specjalistów, w niniejszej recenzji nie będę się skupiał jedynie na ocenie merytorycznej prac, a raczej chciałbym poznać odpowiedzi Doktoranta na zadanie pytania problemowe.

Pierwsza praca koncentruje się na pozyskaniu mikroorganizmów potencjalnie przydatnych do degradacji polietylenu (PE) i polipropylenu (PP). Mikroorganizmy te pozyskano stosując technikę hodowli wzbogacającej, w której testowane polimery były jedynym źródłem węgla, a mikroorganizmy o zdolnościach degradacyjnych pochodziły z gleby pobranej ze składowiska odpadów. Doktorant założył, że gleba taka, ze względu na specyfikę składowiska odpadów, jest zanieczyszczona MPs, co zwiększa szanse na pozyskanie szczepów będących obiektem zainteresowania. Wielotygodniowe hodowle wzbogacające pozwoliły na izolację 14 szczepów bakteryjnych i 13 grzybowych, które autor identyfikuje jako „zdolne do biodegradacji wybranych polimerów”. Spośród nich, 14 izolatów pozyskano z wariantów z zastosowaniem PE, natomiast pozostałe 13 z wariantu, w którym wykorzystano PP. Najczęściej identyfikowanymi szczepami bakteryjnymi frakcji hodowlanej były *Priestia megaterium* i *Serratia marcescens* odpowiednio w przypadku prób inkubowanych z PE i PP. Bakterie z rodzaju *Enterobacter* spp. zostały z kolei

zidentyfikowane w obu wariantach polimerowych. Wśród wariantów inkubowanych z mykobiomem najczęściej identyfikowano gatunki *Aspergillus* i *Fusarium*, odpowiednio dla wariantów degradacyjnych PP i PE. W tym miejscu chciałem jednak zapytać, skąd pewność, że wyizolowane szczepy są przedstawicielami mikroorganizmów, które zasiedlały powierzchnię testowanych polimerów i były odpowiedzialne za uwidocznione w SEM uszkodzenia tworzyw, a także za widoczne w analizie FTIR modyfikacje chemiczne świadczące o inicjacji, bądź przebiegu procesów degradacyjnych? Czy możliwe jest, że obserwowany efekt degradacyjny był wynikiem aktywności mikroorganizmów frakcji niehodowalnej, których nie udało się pozyskać na podłożu R2A?

Z opisu metodycznego wynika, że granule polimerowe były sterylizowane termicznie. Czy według Doktoranta zabieg ten wpłynął/mógł wpłynąć istotnie na tempo zasiedlania polimerów przez mikroorganizmy?

Istotne są również wyniki uzyskane w czasie prowadzenia hodowli wzbogacających, które sugerują wysoką skuteczność konsorcjów bakteryjnych i grzybowych w degradacji testowanych tworzyw sztucznych. Zastosowanie odpowiednich metod, to jest mikroskopii i spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera bezspornie potwierdziło inicjację i początkowe etapy procesów degradacyjnych prowadzonych przez mikroorganizmy zasiedlające granule polimerowe w formie biofilmu dla obu testowanych polimerów. Ważną obserwacją jest również potwierdzenie większej podatności polipropylenu na degradację bakteryjną, a polietylenu pod wpływem aktywności grzybów.

W drugiej pracy bakterie o potencjale degradacyjnym Doktorant izolował z gleby pobranej z okolic wysypiska, osadu ściekowego i wody rzecznej. Doktorant założył, że środowiska te różnią się zawartością MPs, co będzie determinowało bioróżnorodność mikrobiologiczną prób, a także potencjał degradacyjny mikroorganizmów zasiedlających te środowiska. Istotnym elementem eksperymentu była także analiza wybranych parametrów fizyko-chemicznych testowanych środowisk, a uzyskane wyniki Doktorant korelował następnie z rezultatami bioróżnorodności mikrobiologicznej. Metodyka eksperymentu zakładała również zwiększenie liczby testowanych tworzyw polimerowych do czterech. W badaniach wykorzystano cztery polimery: poli(chlorek winylu) (PVC), poli(kwas mlekowy) (PLA), poliwęglan (PC) oraz polipropylen (PP). Podobnie jak w poprzedniej opisywanej pracy, istotnym aspektem badań była izolacja szczepów bakterii wykazujących zdolności degradacyjne względem testowanych polimerów, a także ocena stopnia

degradacji tworzyw w czasie wielotygodniowej hodowli wzbogacającej. W tej pracy wykonano także analizy metagenomowe próbek środowiskowych wykorzystanych do założenia hodowli wzbogacających, m.in. w celu weryfikacji bardzo ciekawej hipotezy zakładającej, że zaproponowane podejście badawcze umożliwi pozyskanie wykazujących zdolności degradacyjne izolatów należących do grup słabo reprezentowanych w całkowitej puli mikroorganizmów w danym środowisku. Co istotne, analiza metagenomowa wykazała największą bioróżnorodność genetyczną bakterii w wodzie rzecznej i porównywalne wartości dla gleby i osadu ściekowego. Autor wskazał również 564 operacyjnych jednostek taksonomicznych (OTUs) determinujących różnice pomiędzy badanymi środowiskami. Zidentyfikował rodzaje bakterii charakterystyczne dla poszczególnych środowisk min. *Pseudomonas*, *Saccharomonospora* i *Thermotaphylospora* dla gleby; *Aeromonas*, *Arcobacter*, *Acinetobacter* i *Bacteroides* dla osadu i *Limnohabitans*, *Luteolibacter* oraz przedstawicieli rodziny *Sporichthyaceae* dla wody rzecznej.

Analiza FTIR granul PP nie wykazała zmian istotnych statystycznie w jego strukturze, natomiast w przypadku PVC zidentyfikowano sygnały świadczące o procesach degradacyjnych dla wariantu inokulowanego materiałem glebowym. W przypadku PLA i PC zanotowano znaczne zmniejszenie intensywności pasm charakterystycznych dla grup karbonylowych, co potwierdziła również analiza indeksu karbonylowego (CI). Największe spadki wartości CI dla PLA oraz PC odnotowano w próbach inokulowanych osadem ściekowym, najmniejsze z kolei w próbach zaszczipianych wodą z Wisły. Przytoczone wyniki świadczą o zachodzeniu początkowych etapów procesów degradacyjnych powodowanych przez bakterie wchodzące w skład mikrobiomów testowanych środowisk.

Posiewy hodowli wzbogacających na podłożu R2A doprowadziły do pozyskania łącznie 37 szczepów bakterii, z czego najwięcej - 17 z hodowli inokulowanych glebą pobraną ze składowiska odpadów, 14 z osadu ściekowego i jedynie 6 z wody rzecznej. Są to zatem wyniki mogące potwierdzać przypuszczenie, że w testowanych środowiskach MPs są swego rodzaju czynnikiem selekcyjnym sprzyjającym izolacji bakterii zdolnych do ich degradacji. Potwierdzeniem tego faktu jest również brak korelacji pomiędzy bioróżnorodnością alfa prób środowiskowych, a indeksem karbonylowym świadczącym o postępującej degradacji polimerów. Wobec tego chciałem zapytać czy podjęto próbę oszacowania ilości MPs w poszczególnych środowiskach, tak aby zamienić przypuszczenia w niezaprzeczalny fakt? Jaką metodę można proponować do takich oznaczeń i czy

jej zastosowanie jest planowane w razie kontynuacji tego typu badań? Dla testowanych hodowli z czterema polimerami Doktorant pozyskał szczepy unikalne dla danych układów, a także uniwersalne, które identyfikowano we wszystkich środowiskach i układach degradacyjnych. Jako przykład gatunku uniwersalnego podano *Pseudomonas aeruginosa*. Nasuwa się zatem pytanie, czy tego typu szczepy, pomimo potencjału degradacyjnego i pożądanых cech mogą być wykorzystywane w doświadczeniach bioremedacyjnych? Czy mogą wchodzić w skład preparatów dostępnych w handlu, ewentualnie czy badania naukowe z ich udziałem powinny być kontynuowane? Chciałem również zapytać Doktoranta jak ocenia przydatność szczepów przetrwalnikujących, takich jak wspomniana wcześniej *Priestia megaterium*, w badaniach biodegradacyjnych?

W rozdziale 8.1 pracy doktorskiej Doktorant opisał wyniki doświadczeń, które polegały na analizie bioróżnorodności grzybów w testowanych próbach środowiskowych, a także późniejszym wykorzystaniu tych prób jako inokulum w badaniach degradacyjnych w warunkach hodowli wzbogacających. Mgr Mariusz Wróbel podjął również próbę izolacji szczepów potencjalnie przydatnych w badaniach biodegradacyjnych. Podsumowując, schemat badań opisanych w tej części jest zbieżny z tym zaprezentowanym w pracy numer dwa, inna jest natomiast grupa mikroorganizmów będących przedmiotem zainteresowania.

Analiza statystyczna alfa-różnorodności badanych środowisk wykazała istotne różnice pod względem obserwowanych OTU między składem zespołów grzybów (mykobiomem) osadu ściekowego i gleby, a każdy analizowany mykobiom posiadał względnie wysoką liczbę unikalnych OTU, charakterystycznych dla danego środowiska (w osadzie ściekowym zidentyfikowano najwięcej unikalnych OTU – 723, w porównaniu do materiału glebowego i wody). Doktorant wykazał, iż grzyby należące do gromady Ascomycota dominowały w strukturach badanych mykobiomów materiału glebowego (88%), osadu ściekowego (65,0%) i wody (36,6%). Wśród bardzo często obserwowanych grzybów w mykobiomie osadu ściekowego i wody znalazły się również mikroorganizmy reprezentujące gromady Chytridiomycota (stanowiąc odpowiednio: 4,9% i 25,5%) oraz Basidiomycota (odpowiednio 16,3% i 12,6%).

Podobnie jak dla zespołów bakteryjnych badanych w pracy numer dwa, dla grzybów również przeprowadzono analizę mającą na celu wskazanie mikroorganizmów najbardziej wpływających na zróżnicowanie badanych prób środowiskowych. Zidentyfikowano 67 takich markerów. Rodzaje specyficzne dla gleby obejmowały *Thermomyces* i *Melanocarpus*, natomiast grzyby z rodzaju

Mycoacia, *Butyriboletus*, niesklasyfikowane *Rozellomycota*, *Geotrichum*, *Cheilymenia*, niesklasyfikowane *Saccharomycetales* czy *Dipodascus* były najbardziej charakterystyczne dla osadu ściekowego. Mykobiom wodny charakteryzował się z kolei obecnością niesklasyfikowanych *Rhizophydiales*, niesklasyfikowanych *Agaricomycetes*, niesklasyfikowanych *GS04* i *Dothidea*.

Posiewy z hodowli wzbogacających umożliwiły izolację 30 gatunków grzybów, z których najwięcej (18) wyizolowano z hodowli inokulowanych glebą. Wśród izolatów dominowały grzyby z rodzaju *Fusarium* spp. (13), które stanowiły 43% wszystkich pozyskanych mikroorganizmów hodowlanych. Cztery izolaty zaklasyfikowano jako przedstawicieli z rodzaju *Penicillium* spp., a po trzy przypisano do rodzaju *Galactomyces* spp. i *Neosetophoma* spp.

Analiza FTIR nie wykazała zmian degradacyjnych w widmach charakterystycznych dla PP. Z kolei, analiza widm dla PVC, PLA i PC wykazała zmiany w zakresach charakterystycznych dla grup karbonylowych, co wraz z wynikami uzyskanymi w analizie SEM może świadczyć o mikrobiologicznej degradacji tych tworzyw.

Uzyskane w trakcie badań wyniki były podstawą do wysunięcia następujących **wniosek**:

- Poziom bioróżnorodności alfa mikrobiomu środowiskowego nie determinuje szybkości ani efektywności procesu biodegradacji;
- Bakterie i grzyby charakteryzują się odmienną efektywnością biodegradacji polimerów o zróżnicowanych właściwościach chemicznych. Badania wykazały, że grzyby mają znacznie wyższy potencjał degradacyjny w stosunku do polietylenu (PE), podczas gdy bakterie wykazują lepsze właściwości biodegradacyjne w odniesieniu do polipropylenu (PP);
- Środowiska, które były potencjalnie bardziej zanieczyszczone polimerami były lepszym źródłem mikroorganizmów zdolnych do degradacji tworzyw sztucznych;
- Polimery obecne w różnych środowiskach mogą selekcjonować z ich mikrobiomów podobne rodzaje bakterii i grzybów.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji praca doktorska przygotowana przez mgr. Mariusza Wróbla stanowi wartościowy wkład Doktoranta i Zespołu, z którym współpracował w rozwój nauki z zakresu biologicznego oczyszczania środowisk skażonych MPs. Zawarte w niniejszej recenzji komentarze i pytania mają na celu wywołanie dyskusji naukowej, która jest niezbędnym elementem

Strona 7

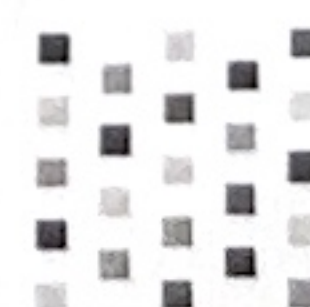


warunkującym rozwój nauki, a także młodych badaczy. Bardzo proszę o odniesienie się do tych uwag podczas publicznej obrony.

Praca napisana jest starannie, pojawiają się jedynie nieliczne błędy edytorskie, czy stylistyczne. Na rysunku 14 zamienione zostały widma pełnego zakresu i szczegółowe, mam również wrażenie, że pominięto ich analizę w tekście rozprawy. Nietypowy jest również sposób zamieszczania rysunków, które pojawiają się w pracy wcześniej, niż nawiązanie w tekście. **Dyskusja** wyników prowadzona jest w logiczny i ciekawy sposób, z wykorzystaniem dobrze dobranych **odnośników literaturowych**.

Do istotnych osiągnięć Doktoranta należy zaliczyć:

- Opracowanie metody zwiększającej szanse na pozyskanie hodowalnych szczepów mikroorganizmów o potencjale do degradacji wybranych polimerów;
- Weryfikacja przydatności trzech środowisk do izolacji szczepów mikroorganizmów degradujących MPs;
- Stworzenie kolekcji mikroorganizmów potencjalnie przydatnych w procesach bioremediacji środowisk skażonych MPs (zdolności degradacyjne powinny być zweryfikowana doświadczalnie);
- Uwzględnienie w doświadczeniach nie tylko bakterii, ale również trudniejszych w analizie grzybów;
- Weryfikacja bardzo ciekawych pod względem naukowym hipotez badawczych;
- Uzyskanie wyników o wysokim potencjale publikacyjnym;
- Opublikowanie 2 prac naukowych w prestiżowych czasopismach z listy JCR.





Analiza przedstawionego do recenzji tekstu pracy doktorskiej oraz opisanego w niej warsztatu metodycznego Doktoranta uprawnia do twierdzenia, iż mgr Mariusz Wróbel jest sprawnym młodym badaczem, który opanował sztukę prowadzenia badań naukowych, statystycznej i bioinformatycznej analizy rezultatów, krytycznego podejścia do uzyskanych wyników, a także redakcji tekstów naukowych. Zakres przeprowadzonych badań należy uznać jako znaczący. Uzyskane rezultaty opublikowano w wartościowych czasopismach naukowych, a wkład Doktoranta w ich powstanie można uznać za wiodący. Te wszystkie argumenty skłaniają mnie do postawienia poniższego wniosku końcowego.

WNIOSEK KOŃCOWY

Po zapoznaniu się z otrzymanymi materiałami jestem przekonany, że przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr. Mariusza Wróbla spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). **Zgłaszam zatem formalny wniosek do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne, Wydziału Chemii, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr. Mariusza Wróbla do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki chemiczne, w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych.**

Mariusz Prociwczak

