

Prof. dr hab. Beata Podkościelna
Wydział Chemii, Instytut Nauk Chemicznych
Katedra Chemii Polimerów
ul. Gliniana 33, 20-614 Lublin
tel: +48 81 524 22 51 w. 137

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgra Mariusza Wróbla

pt.

„Biodegradacja mikroplastików przez mikroorganizmy pochodzące ze środowiska naturalnego i antropogenicznego”

Podstawa: uchwała Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne, Wydziału Chemii, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu oraz pismo Pani Dziekan Wydziału Chemii UMK w Toruniu prof. ucz. dr hab. Urszuli Kielkowskiej z dnia 09 kwietnia 2025 r.

Podstawa prawna: art. 190 ust.2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t. j. Dz. U. z 2018 poz. 1668 z poz. zm.).

Cel i zakres pracy

Rozprawa doktorska mgra Mariusza Wróbla wykonana została w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitik, Wydziału Chemii, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod opieką naukową dr hab. Tomasza Kowalkowskiego, prof. UMK. Promotorem pomocniczym rozprawy była dr Sonia Szymańska z Katedry Mikrobiologii, Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Recenzowana praca dotyczy badań nad selekcją i identyfikacją mikroorganizmów zdolnych do degradacji polimerów. Autor postawił sobie kilka hipotez badawczych (dokładnie 5) które są poprawnie sformułowane, może tylko w niektórych miejscach wymagają uwagi i tak np. wyrażenie „podobne taksony” można doprecyzować.

Biodegradacja tworzyw sztucznych odgrywa istotną rolę w kontekście współczesnych wyzwań środowiskowych. Tradycyjne polimery syntetyczne cechują się wyjątkowo długim czasem rozkładu, co prowadzi do ich akumulacji w środowisku i generowania trudnych do usunięcia zanieczyszczeń. Idealnym rozwiązaniem byłoby wprowadzenie materiałów

biodegradowalnych, które ulegają rozkładowi przy udziale mikroorganizmów do związków nieszkodliwych dla środowiska. Z perspektywy gospodarki o obiegu zamkniętym, rozwój takich materiałów wpisuje się w strategię ograniczania ilości odpadów i minimalizacji wpływu na ekosystemy lądowe i morskie. W ostatnich latach coraz większą uwagę poświęca się także możliwości biodegradacji konwencjonalnych plastików, takich jak polietylen, polipropylen czy politereftalan etylenu, za pomocą wybranych szczepów mikroorganizmów, w tym bakterii i grzybów. Choć tempo tych procesów jest nadal niskie w porównaniu do biopolimerów, trwają intensywne badania nad ich przyspieszeniem poprzez modyfikacje genetyczne mikroorganizmów oraz zastosowanie warunków sprzyjających biodegradacji, takich jak wysoka wilgotność, temperatura czy obecność określonych dodatków. Odkrycia te mają ogromny potencjał w kontekście bioremediacji i mogą stanowić uzupełnienie tradycyjnych metod utylizacji odpadów tworzywowych.

W mojej opinii jest to temat niezwykle aktualny, co w pełni uzasadnia prowadzenie badań w ramach przedłożonej rozprawy doktorskiej oraz podkreśla ich nowatorski charakter.

Ocena merytoryczna rozprawy

Rozprawa doktorska **mgra Mariusza Wróbla** została napisana w języku polskim i przygotowana w formie dwóch artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie z bazy JCR oraz w pracy omówiony został materiał nieopublikowany. Praca składa się z 13 części i liczy 128 stron, z czego 46 stron stanowią kopie prac. Jako pierwszy w pracy umieszczony jest *Wykaz Skrótów i Oznaczeń*. Rozdział 1 i 2 to *Streszczenie pracy* w j. polskim i angielskim. Rozdział 4 to *Wstęp* w który Autor wprowadza w temat polimerów, zagrożeń płynących z ich stosowania oraz opisuje proces degradacji polimerów. Polimery termoplastyczne, takie jak PE, PP i PVC, ze względu na swoje masowe zastosowanie, stanowią poważne źródło zanieczyszczeń środowiskowych. Blisko 60% odpadów z tworzyw trafia bezpośrednio do środowiska, co prowadzi do jego degradacji. Jedną z obiecujących metod przeciwdziałania temu zjawisku jest biodegradacja mikrobiologiczna, której potencjał jest znaczny, choć wiedza na jej temat nadal pozostaje ograniczona. Autor zwraca uwagę, że biodegradacja tworzyw sztucznych to złożony, wieloetapowy proces obejmujący biodeteriorację, biofragmentację, bioasymilację i mineralizację, w którym kluczową rolę odgrywają enzymy mikroorganizmów i ich zdolność do tworzenia biofilmu. Proces ten rozpoczyna się od chemicznych zmian w strukturze polimeru i tworzenia tzw. „plastisfery” przez taksony drobnoustrojów, takie jak *Pseudomonas* czy *Cladosporium*. Następnie dochodzi do rozpadu łańcuchów polimerowych i

powstawania związków pośrednich, które są dalej metabolizowane i przekształcane w CO₂ i wodę. Każdy etap biodegradacji wymaga zastosowania odpowiednich technik analitycznych – od SEM i FTIR po chromatografię żelową (GPC), GC-MS oraz testów określających produkcję CO₂. Złożoność procesu wymaga wszechstronnej analizy fizykochemicznej i mikrobiologicznej, by uchwycić zmiany zachodzące w strukturze i masie polimerów. Pomimo rosnącej liczby badań, wiedza na temat efektywnej degradacji wciąż pozostaje niepełna, a rzeczywisty potencjał wielu mikroorganizmów nie został jeszcze w pełni rozpoznany.

Autor opiera swoją rozprawę tylko na dwóch artykułach naukowych ale są one opublikowane w renomowanych czasopismach o wysokim współczynniku wpływu (IF).

W publikacji nr. 1 (*Wróbel, M., Szymańska, S., Kowalkowski, T., & Hrynkiewicz, K. (2023). Selection of microorganisms capable of polyethylene (PE) and polypropylene (PP) degradation. Microbiological Research, 267, 127251. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127251> (IF=6,1; pkt. MNiSW=100)*) opracowano skuteczną metodę selekcji mikroorganizmów zdolnych do degradacji polietylenu (PE) i polipropylenu (PP), izolując je z materiału biologicznego pochodzącego z wysypiska odpadów. Zidentyfikowano łącznie 14 szczepów bakteryjnych i 13 grzybowych o potencjale degradacyjnym względem PE i PP. W przypadku PE największy potencjał degradacyjny wykazały grzyby z rodzaju *Fusarium*, *Lecanicillium* i *Trichoderma* oraz bakterie takie jak *Priestia megaterium* czy *Pseudomonas fluorescens*. Natomiast dla PP dominowały bakterie z rodzaju *Serratia* i *Enterobacter*, a także grzyby *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium*. Analiza powierzchni za pomocą mikroskopii skaningowej (SEM) wykazała obecność biofilmu oraz znaczne uszkodzenia mechaniczne powierzchni polimerów, szczególnie PP po inkubacji z bakteriami. Dla PE najbardziej widoczne zmiany wystąpiły po ekspozycji na grzyby, co sugeruje wyższą skuteczność grzybów w degradacji tego polimeru. Badania spektroskopowe FTIR potwierdziły zmiany w strukturze chemicznej obu polimerów po inkubacji z mikroorganizmami, takie jak pojawienie się nowych pasm związanych z obecnością tlenu i spadek intensywności charakterystycznych pasm. Zaobserwowane zmiany wskazują na inicjację procesów degradacji przez wydzielane enzymy mikroorganizmów. Szczególnie istotne jest potwierdzenie większego powinowactwa bakterii do degradacji PP, natomiast grzybów – do PE. Badania dowodzą, że selekcja mikroorganizmów z wysypisk odpadów może być skuteczną strategią pozyskiwania szczepów o wysokim potencjale biodegradacyjnym.

W publikacji nr. 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.142933> (IF=8,1; pkt. MNiSW=140)) oceniono różnorodność i strukturę bakteryjnych mikrobiomów pochodzących z trzech różnych środowisk: gleby składowiskowej, osadu ściekowego i wody rzecznej, pod kątem ich zdolności do biodegradacji mikroplastików (MPs). Mikrobiomy zostały wzbogacone o mikroplastiki takie jak PP, PVC, PC i PLA, co umożliwiło selekcję i ocenę szczepów bakteryjnych zaangażowanych w degradację polimerów. Najwyższą różnorodność alfa zaobserwowano w próbkach z wody rzecznej, natomiast dominujące typy bakterii różniły się w zależności od środowiska: *Actinomycetota* przeważały w glebie, a *Pseudomonadota* w osadzie i wodzie. W wyniku eksperymentu wyizolowano łącznie 37 szczepów degradujących tworzywa – najwięcej z gleby (17), osadu (14) i wody (6). Analiza FTIR i wskaźników karbonylowych potwierdziła znaczne zmiany strukturalne w polimerach, zwłaszcza PVC z gleby i PLA/PC z osadu ściekowego. Zaobserwowano, że mikrobiomy, mimo odmiennego pochodzenia, wykazywały podobne spektrum rodzajów bakterii zdolnych do degradacji plastiku. Kluczowe znaczenie dla efektywnej biodegradacji miała obecność określonych taksonów, a nie ogólna różnorodność mikrobiomu. Szczególną rolę odgrywały rzadkie taksony, które choć nieliczne, wykazywały wysoką aktywność degradacyjną w warunkach selektywnego nacisku mikroplastików. Badanie potwierdza skuteczność wzbogacania mikrobiomów środowiskowych jako metody izolacji szczepów przydatnych w zarządzaniu odpadami tworzyw sztucznych. Wyniki sugerują istnienie uniwersalnego mechanizmu biodegradacji, aktywowanego przez konkretne grupy bakterii obecne w różnych środowiskach.

Rozdział 5 zawiera *Cel badań* który ogólnie dotyczył oceny zależności między strukturą chemiczną polimerów, bioróżnorodnością mikrobiomów badanych środowisk a efektywnością procesów biodegradacji. Następny rozdział zawiera Hipotezy badawcze które w 5 podpunktach zawierają najważniejsze twierdzenia, które Autor weryfikował podczas realizacji swoich badań. Z kolei Rozdział 7 to *Metodologia badań* w której Doktorant zaproponował w formie schematu koncepcję swojej pracy. Jest to bardzo dobry pomysł tylko gorzej z jego wizualizacją i wielkością czcionek.

Proces izolacji mikroorganizmów rozpoczęto od przygotowania mieszaniny tworzyw sztucznych z rozcieńczonym materiałem środowiskowym i antybiotykami, które umożliwiły

selektywną hodowlę określonych mikroorganizmów. Po inkubacji trwającej 12 i 15 tygodni przeprowadzono selekcję na podstawie morfologii kolonii oraz identyfikację wszystkich szczepów. Do oceny degradacji tworzyw wykorzystano skaningową mikroskopię elektronową (SEM) oraz spektroskopię FTIR. W Rozdziale 7.1 *Przygotowanie materiału polimerowego* Autor napisał, że w *badaniach wykorzystano tworzywa w formie mikroplastiku. Wyjściowym produktem były polimery w postaci granulek (polietylen (PE), polipropylen (PP), polichlorek winylu (PVC), polilaktyd (PLA) i poliwęglan (PC)) otrzymane z Katedry Chemii Fizycznej i Fizykochemii Polimerów Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Czy to oznacza, że otrzymano tam te polimery czy wykorzystano polimery zakupione wcześniej przez tę katedrę, brak jest informacji o producencie ani o podstawowych właściwościach fizyko-chemicznych (także w publikacji). Autor przedstawia pobieranie prób środowiskowych ze składowiska należącego do Miejskiego Przedsiębiorstwa Oczyszczania Sp. z o.o. w Toruniu, osad ściekowy (z Grudziądza) oraz wodę rzeczną (z Wisły w Toruniu). Dokonano analizy parametrów fizykochemicznych wody, materiału glebowego oraz osadu ściekowego. Dokonano izolacja metagenomowego DNA z w/w źródeł oraz przeprowadzono analizy materiału biologicznego. Następnie dokonano izolacji i selekcji mikroorganizmów degradujących polimery. Wybrane szczepy bakteryjne zidentyfikowano na podstawie sekwencjonowania genu 16S rRNA. Ocenę ilościową biofilmu wytworzonego przez bakterie na powierzchni polimerów wykonano po 8, 10 i 12 tygodniach inkubacji granulek polimerowych z mikrobiomem środowiskowym. Do oceny wpływu mikroorganizmów na powierzchnię polimerów PE i PP wykorzystano skaningową mikroskopię elektronową (SEM), analizując łącznie 144 granulki w różnych warunkach eksperymentalnych (różne gleby, rozcieńczenia, mikroorganizmy, czasy inkubacji i kontrole). Obserwacje przeprowadzono przy różnych powiększeniach, porównując próbki zakażone mikroorganizmami z próbkami kontrolami w celu oceny zmian powierzchniowych. Analizę degradacji polimerów po inkubacji z materiałem glebowym przeprowadzono za pomocą spektroskopii FTIR. Autor prezentuje w pracy także tabelaryczne zestawienie technik i metod wykorzystanych w poszczególnych zadaniach badawczych co ułatwia rozeznanie się w zgromadzonym materiale badawczym.*

Rozdział ósmy (Wyniki) zawiera wyniki niepublikowane i podzielony jest na kilka sekcji poświęconych strukturze i różnorodności mykobiomu, identyfikacji szczepów grzybowych oraz ocenie ich wpływu na materiały polimerowe z użyciem FTIR.

Z kolei Rozdział dziewiąty (Dyskusja) analizuje zależności między mikrobiomem a efektywnością biodegradacji, wpływ środowiskowych polimerów na selekcję

mikroorganizmów, różnice między grzybami a bakteriami oraz zmiany na powierzchni materiałów.

Podsumowując do najważniejszych wniosków z pracy można zaliczyć:

- Poziom bioróżnorodności alfa mikrobiomu nie przesądza o tempie ani skuteczności biodegradacji tworzyw sztucznych. Kluczowe znaczenie ma obecność wyspecjalizowanych mikroorganizmów, takich jak *Pseudomonas spp.* i *Fusarium spp.*, które mimo niskiej liczebności w mikrobiomie, posiadają wysokie zdolności degradacyjne i metaboliczne.
- Badania potwierdzają, że grzyby i bakterie różnią się efektywnością biodegradacji w zależności od rodzaju polimeru. Grzyby skuteczniej degradują polietylen, natomiast bakterie lepiej radzą sobie z biodegradacją polipropylenu, co wynika z ich prostszych wymagań metabolicznych. Różnice te są związane m.in. ze stopniem hydrofobowości tworzyw oraz specyfiką metabolizmu mikroorganizmów.
- Środowiska silniej zanieczyszczone polimerami, takie jak gleby ze składowisk odpadów i osady z oczyszczalni ścieków, okazały się lepszym źródłem mikroorganizmów zdolnych do degradacji plastiku niż woda rzeczna. Wyższy poziom zanieczyszczenia sprzyja selekcji i namnażaniu mikroorganizmów rozkładających tworzywa sztuczne, co czyni te środowiska bardziej efektywnymi pod względem biodegradacyjnym.

Pytania do pracy:

1. Jakie czynniki środowiskowe, poza poziomem zanieczyszczenia polimerami, mogą dodatkowo wpływać na selekcję i aktywność mikroorganizmów degradujących tworzywa sztuczne?
2. Czy w różnych środowiskach można znaleźć te same mikroorganizmy rozkładające plastik? Jeśli tak, to czy da się je wykorzystać do oczyszczania zanieczyszczonych miejsc na skalę przemysłową?
3. Jak długi byłby proces degradacji tworzywa przy użyciu mikroorganizmów na podstawie przeprowadzonych badań?
4. Prezentowane badania mają potencjał aplikacyjny, czy jest możliwa ich komercjalizacja?

Wniosek końcowy:

Biorąc pod uwagę powyższe fakty stwierdzam jednoznacznie, że przygotowana przez Pana
mgra Mariusza Wróbla praca pt.

*„Biodegradacja mikroplastików przez mikroorganizmy pochodzące ze środowiska
naturalnego i antropogenicznego”*

spełnia wszystkie kryteria stawiane pracom doktorskim, wymienione w Ustawie art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t. j. Dz. U. z 2024 poz. 1571) dlatego też kieruję do *Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne, Wydziału Chemii, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu* oraz *pismo Pani Dziekan Wydziału Chemii UMK w Toruniu* wniosek o dopuszczenie Autora do kolejnych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Lublin, 02.06.2025

Beata Podkościelna