

Skierniewice 18.07.2016r.

Dr hab. Lidia Sas Paszt
Pracownia Rizosfery
Zakład Mikrobiologii
Instytut Ogrodnictwa
Pomologiczna 18
96-100 Skierniewice
Tel: 46 8345235
tel komórkowy: 503 158 903
e-mail: lidia.sas@inhort.pl
www.inhort.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Oszust p.t. „Opracowanie Biopreparatu enzymatycznego do optymalizacji procesu fermentacji metanowej mieszanki odpadów organicznych oraz określenie zmian struktury metanogenów w biomacie fermentacyjnej”

Tematyka badań podjętych przez Panią mgr Karolinę Oszust jest bardzo ciekawa poznawczo i praktycznie. Obejmuje opracowanie biopreparatu enzymatycznego o nazwie *metaferm* do optymalizacji procesu fermentacji metanowej mieszanki odpadów organicznych. Nowoopracowany biopreparat do hydrolizy biomasy mieszanki odpadów organicznych zapewnia wysoką wydajność produkcji biogazu i zwiększenie biogazodochodowości.

Praca doktorska Pani mgr Karoliny Oszust została przygotowana w sposób prawidłowy, typowy dla doktorskich prac eksperymentalnych, liczy 164 strony i składa się z 10 rozdziałów (streszczenie, przegląd literatury, cele i hipotezy badawcze, materiały i metody, wyniki i dyskusja, wnioski, wykaz skrótów, spis rysunków i tabel, literatura, schematy płytek panelu PM BIOLOG). W tekst rozprawy wkomponowano 31 rysunków i 28 tabel.

Przedłożona praca wnosi nowe, bardzo cenne informacje na temat strategii efektywnego wykorzystania odnawialnych źródeł energii poprzez hydrolizę mikrobiologiczną odpadów ligninocelulozowych i ich beztlenowe przetwarzanie. Praca ma charakter poznawczy, gdyż wnosi nowe informacje na temat zmian składu konsorcjum metanogenów w biomacie fermentacyjnej. Utylizacyjny charakter pracy obejmuje opracowanie biopreparatu pochodzenia mikrobiologicznego dla poprawy efektywności procesu fermentacji metanowej mieszanki odpadów organicznych.

Innowacyjny preparat opracowano w oparciu o mikrobiologiczne badania skringowe, koncentrujące się na poszukiwaniu szczepów mikroorganizmów o wysokich właściwościach hydrolitycznych oraz dobór odpowiednich podłoży do produkcji enzymów celulolitycznych.

Z osadu z oczyszczalni ścieków mleczarskich wyizolowano szczep grzyba *Trichoderma atroviride* G 79 1 1, o wysokiej aktywności kompleksu celulolitycznego i scharakteryzowano go pod względem właściwości fenotypowych. Zoptymalizowano podłoże hodowlane i warunki prowadzenia hodowli oraz określono najkorzystniejsze pH i temperaturę dla katalitycznego działania enzymów celulolitycznych *T. atroviride* G 79 1 1. Opracowano dwie formy biopreparatu *metaferm* (płynną i zagęszczoną), chronione znakiem towarowym. Sposób otrzymywania biopreparatu opisano także w treści zgłoszenia patentowego.

Przeprowadzono szczegółową charakterystykę właściwości biopreparatu *metaferm*. Duża różnorodność aktywności enzymatycznych, wchodzących w skład biopreparatu *metaferm* stanowi o jego konkurencyjności w stosunku do komercyjnych biopreparatów enzymatycznych. **Zaproponowany sposób prowadzenia kondycjonowania odpadów organicznych z zastosowaniem biopreparatu w kierunku zwiększenia produkcji biogazu jest innowacyjny w skali kraju i świata.** Aplikacyjny potencjał biopreparatu *metaferm* polega na zwiększeniu efektywności procesu fermentacji metanowej odpadów organicznych. Biopreparat, zarówno w formie płynnej, jak też w postaci liofilizowanej stosowany do wstępnej hydrolizy biomasy spowodował wzrost wydajności produkcji biogazu od około 4% do około 30%, w zależności od formy, dawki oraz sposobu aplikacji preparatu.

Wykazano wpływ biopreparatu na strukturę zbiorowiska metanogenów w biomacie pofermentacyjnej, polegający na zwiększeniu udziału *Methanosaeta* i zmniejszeniu *Methanosarcina* w masie pofermentacyjnej. Monitoring zmian strukturalnych tego zbiorowiska w trakcie prowadzenia procesu fermentacji metanowej pozwolił na ocenę stopnia stabilności procesu.

W rozdziale „Przegląd literatury” Doktorantka omówiła obiecującą strategię efektywnego wykorzystania odnawialnych źródeł energii, tj. hydrolizę mikrobiologiczną odpadów ligninocelulozowych i zgazowanie produktów. Przedstawiła także strategię pozyskiwania efektywnego kompleksu enzymów celulozowych z hodowli mieszanych mikroorganizmów. Biogaz to obiecujące źródło energii odnawialnej, gdyż technologia jego produkcji łączy procesy utylizacji odpadów organicznych z wytworzeniem uniwersalnego nośnika energii – metanu. Doktorantka omówiła enzymy celulozowe, a także metagenomy w aspekcie różnicowania morfologicznego, wykorzystania różnych substratów i sekwencjonowania nowej generacji.

Rozdział „Cele i hipotezy badawcze” napisany jest w sposób prawidłowy i uzasadnia celowość podjętych badań. Hipotezy badawcze są właściwie ukierunkowane na opracowanie biopreparatu enzymatycznego do optymalizacji procesu fermentacji metanowej mieszanki odpadów organicznych.

W rozdziale „Materiał i metody” Doktorantka jasno i precyzyjnie opisała zastosowane metody i techniki badawcze, które posłużyły do realizacji etapów badań, tj. badania skiniogowe wybranych odpadów organicznych, selekcja szczepów mikroorganizmów o właściwościach hydrolitycznych, charakterystyka i optymalizacja warunków hodowli szczepu o wysokiej aktywności celulozowej, opracowanie, charakterystyka i ocena możliwości aplikacyjnych biopreparatu *metaferm*. Doświadczenia zaprojektowano logicznie i wykonano je prawidłowo. Optymalizacja składu biopreparatu celulozowego oraz przedstawienie krytycznych etapów i warunków wytwarzania preparatu świadczy o bardzo dobrej naukowo-badawczej dojrzałości doktorantki. W ramach przeprowadzonych badań Doktorantka przeanalizowała obszerny materiał doświadczalny, który wymagał dużego nakładu pracy i zaangażowania, a następnie właściwej interpretacji i dyskusji uzyskanych wyników badań.

W rozdziale „Wyniki i dyskusja” Doktorantka w sposób logiczny i szczegółowy opisuje uzyskane wyniki badań. Wnoszą one nowe informacje na temat charakterystyki szczepu *T. atroviride* G7911 oraz struktury zbiorowiska metanogenów w masie fermentacyjnej. Obszerność doświadczalnego materiału mikrobiologicznego zaowocowała dużą ilością wyników, które prawidłowo opracowano statystycznie i przedstawiono w sposób jasny i syntetyczny na 67 stronach. Wnoszą one nowe informacje na temat charakterystyki i możliwości wykorzystania biopreparatu *metaferm*. Doktorantka przeprowadziła wnikliwą dyskusję uzyskanych wyników, odnosząc się do rezultatów badań innych autorów. Merytoryczna

część pracy kończy się prawidłowo sprecyzowanymi wnioskami, które odpowiadają na cele badań. Doktorantka określiła aktywność celulolityczną szczepu, zoptymalizowała warunki hodowli szczepu *T. atroviride* G79_11 i warunki do działania enzymów celulolitycznych. Opracowała i scharakteryzowała preparat pod kątem aktywności enzymatycznej. Prace te prowadzono wieloetapowo i wymagały dużych umiejętności laboratoryjnych, wiedzy z zakresu mikrobiologii oraz ciągłego doskonalenia warsztatu pracy.

Do najważniejszych osiągnięć pracy zaliczam: opracowanie biopreparatu enzymatycznego o nazwie *metaferm* do optymalizacji procesu fermentacji metanowej mieszanki odpadów organicznych, wybór odpowiedniego szczepu mikroorganizmu (*Trichoderma atroviride* G79_11), dobór składników podłoża produkcyjnego oraz optymalizację warunków prowadzenia hodowli umożliwiającej wysoką produkcję celulaz i innych enzymów hydrolitycznych. Duża specyficzność substratowa białek enzymatycznych, wchodzących w skład opracowanego biopreparatu stanowi o jego innowacyjności i konkurencyjności w stosunku do dostępnych na rynku biopreparatów enzymatycznych.

Praktycznym wynikiem pracy jest zastosowanie biopreparatu do hydrolizy biomasy mieszanki odpadów organicznych i uzyskanie znaczącego wzrostu wydajności produkcji biogazu i zwiększenie biogazodochodowości. Praca proponuje ciekawą strategię efektywnego wykorzystania odnawialnych źródeł energii poprzez hydrolizę mikrobiologiczną odpadów ligninocelulozowych i ich beztlenowe przetwarzanie. Bardzo wartościowa jest ocena zbiorowiska metanogenów w masie fermentacyjnej, w procesie zwiększania wydajności produkcji biogazu. Na szczególną uwagę zasługuje wyizolowanie 67 szczepów grzybów i 74 szczepów bakterii oraz określenie ich właściwości hydrolitycznych, pektynolitycznych i celulolitycznych. Wyniki charakterystyki fenotypowej szczepu *T. atroviride* G79_11 stanowią charakterystykę opracowanego biopreparatu w zakresie występowania aktywności enzymów o różnej specyficzności. Uzyskane wyniki umożliwią opłacalne zastosowanie enzymów celulolitycznych szczepu *T. atroviride* G79_11 w konwersji biomasy bądź jej degradacji.

Bibliografia obejmuje łącznie 138 pozycji literaturowych, z przewagą anglojęzycznych. Najbardziej aktualne publikacje naukowe w pełni nawiązują do tematu badań. Znajomość literatury przedmiotu wskazuje na bardzo dobre przygotowanie Doktorantki do dalszej pracy naukowo-badawczej.

Stwierdzam, że problematyka podjęta przez Panią mgr Karolinę Oszust jest ważna z punktu widzenia poznawczego i aplikacyjnego. Pod względem merytorycznym pracę oceniam bardzo wysoko. Doktorantka wykazała, że posiada teoretyczną wiedzę z zakresu mikrobiologii i umiejętność samodzielnego prowadzenia prac badawczych. Prawidłowo zinterpretowała wyniki badań oraz właściwie przedyskutowała je z danymi z literatury światowej.

Z obowiązku recenzenta niniejszej rozprawy doktorskiej zgłaszam poniższe uwagi, które nie wpływają na wartość merytoryczną ocenianej pracy, a jedynie mają służyć lepszemu przygotowaniu wyników badań do publikacji:

- W treści pracy stosowany jest termin „uzdolnienia hydrolityczne/celulolityczne lub „zdolność hydrolityczna/celulolityczna”, a powinno być „właściwości hydrolityczne/celulolityczne szczepów”
- Z naukowego punktu widzenia ważnym elementem badań byłoby określenie innych, niż biotechnologiczne, właściwości szczepów należących do rodzaju *Trichoderma* tj. w aspekcie

ich aktywności w pofermencie wykorzystywanym w rolnictwie. Należałoby wówczas określić właściwości ochronne, biostymulacji wzrostu roślin czy bioremediacji gleb zdegradowanych.

- Bardzo wartościowym byłoby wskazanie możliwości zwiększenia termostabilności biopreparatu na bazie szczepu *T. atroviride* G79_11 w celu zwiększenia jego biotechnologicznego zastosowania do kondycjonowania biomasy.

Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa Pani mgr Karoliny Oszust pt. „Opracowanie Biopreparatu enzymatycznego do optymalizacji procesu fermentacji metanowej mieszanki odpadów organicznych oraz określenie zmian struktury metanogenów w biomacie fermentacyjnej” stanowi oryginalne i praktyczne osiągnięcie naukowe i w pełni spełnia wymagania Ustawy o Stopniach i Tytułach Naukowych, z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami. W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN wniosek o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Oszust do dalszych etapów przewodu doktorskiego. **Opracowanie biopreparatu enzymatycznego o nazwie *metaferm* do optymalizacji procesu fermentacji metanowej mieszanki odpadów organicznych jest innowacyjne w skali kraju i świata.**

Z uwagi na duże znaczenie naukowe tematu, innowacyjny i użyteczny charakter pracy oraz sposób przedstawienia wyników wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN wniosek o wyróżnienie powyższej rozprawy doktorskiej.

Lidia Sas Paszt

INSTYTUT OGRODNICIWA
Zakład Mikrobiologii
Pracownik Pracowni Kizosfer
Lidia Sas Paszt
dr hab. Lidia Sas Paszt, prof. nadzw.