

Dr hab. inż. Grzegorz P. Łagód, prof. uczelni  
Politechnika Lubelska  
Wydział Inżynierii Środowiska  
ul. Nadbystrzycka 40B  
20-618 Lublin

Lublin, 5 maja 2023 r.

Recenzja  
rozprawy doktorskiej mgr Kingi Proc-Pietrycha  
pt. „Ocena możliwości wykorzystania *Hermetia Illucens* w entomoremediacji osadów  
po oczyszczaniu ścieków komunalnych”  
wykonanej pod kierunkiem  
Promotora: prof. dra hab. Andrzeja Bieganowskiego  
oraz  
Promotora pomocniczego: dra inż. Piotra Bulaka

1. Podstawa opracowania recenzji

Recenzja opracowana została na zlecenie Dyrektora Instytutu Agrofizyki Im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk Prof. dra hab. Cezarego Sławińskiego, czł. koresp. PAN, z dnia 23 marca 2023 roku.

2. Uzasadnienie celowości podjęcia tematu pracy doktorskiej

Obecnie szeroko identyfikowana jest potrzeba intensyfikacji badań zmierzających do praktycznego wdrażania zasad tzw. gospodarki o obiegu zamkniętym, czyli odzyskiwania cennych surowców i jak najszerszego ponownego wykorzystania produktów ubocznych oraz odpadów powstających w trakcie działalności człowieka. Jednym ze sposobów realizacji zasad gospodarki o obiegu zamkniętym jest szeroko rozumiana bioremediacja, jak również obejmująca ten obszar aktywności entomoremediacja. Proces ten można określać jako wykorzystanie odpowiednio dobranych gatunków owadów i związanych z nimi mikroorganizmów do przeróbki, ekstrakcji, absorpcji lub detoksykacji zanieczyszczeń z osadów, biomasy oraz gleby.

Autorka przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej przeprowadziła badania nad oceną możliwości wykorzystania *Hermetia Illucens* w entomoremediacji osadów po oczyszczaniu ścieków komunalnych. Celowość podjęcia pracy doktorskiej o tej tematyce uważam za uzasadnioną.

3. Ogólna charakterystyka rozprawy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska liczy 114 stron i zawiera w swoim składzie cykl trzech publikacji naukowych skupiających się wokół tematyki zwięźle opisanej w tytule. W każdej ze wspomnianych publikacji Doktorantka jest pierwszym autorem. Dwie prace zostały opublikowane w wysoko punktowanych czasopismach z dużym wskaźnikiem IF.

Praca P1 – Proc K., Bulak P., Wiącek D., Bieganowski A. *Hermetia illucens* exhibits bioaccumulative potential for 15 different elements – implications for feed and food production. *SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT* 2020, 723, 138125 posiada wskaźnik Impact Factor z roku opublikowania 7,963, zaś według punktacji Ministerstwa Edukacji i Nauki sklasyfikowana jest na poziomie 200 punktów.

Praca P2 – Proc K., Bulak B., Kaczor K., Bieganowski A. A new approach to quantifying bioaccumulation of elements in biological processes. *BIOLOGY* 2021, 10, 345 posiada wskaźnik Impact Factor z roku opublikowania 5,079, zaś według punktacji Ministerstwa Edukacji i Nauki sklasyfikowana jest na poziomie 100 punktów.

Ostatnia z prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej P3 – Proc-Pietrycha K., Bulak B., Kaczor K., Bieganowski A. Entomoremediation of municipal digested sewage sludge by *Hermetia illucens* with and without the addition of optimal feed jest na etapie recenzji w wydawnictwie.

Z załączonych w pracy oświadczeń współautorów (str. 110-114) wynika, że w przypadku publikacji wchodzących w skład doktoratu, ich wkład polegał głównie na: pomocy technicznej w prowadzeniu hodowli macecznej oraz eksperymentów, pomocy w obliczeniach, pomocy w przygotowaniu manuskryptu i pomocy przy opracowaniu do nich przeglądu literatury, przeprowadzenie oznaczeń na specjalistycznym sprzęcie analitycznym (ICP-MS), a w wypadku promotora i promotora pomocniczego konsultacji i pomocy na wszystkich etapach pracy nad doktoratem, konsultacji w opracowaniu koncepcji badań oraz metodologii badań, konsultacji i nanoszenia poprawek manuskryptów publikacji i doktoratu, a także współdziałał w opracowaniu koncepcji wskaźnika BAI. Tak więc na podstawie załączonych oświadczeń można przyjąć, że ważne dla powstania pracy naukowej etapy, tj.: przygotowanie koncepcji badań, prowadzenie badań, opracowanie wyników oraz napisanie bazowej wersji manuskryptu publikacji wchodzących w skład doktoratu, realizowanie były przez mgr Kingę Proc-Pietrycha. Poza załączonymi oświadczeniami, pośrednim dowodem na jej znaczącą rolę w powstaniu wszystkich wspomnianych publikacji jest fakt, że Doktorantka jest pierwszą autorką we wspomnianych pracach.

Zamieszczony w pracy spis literatury zawiera 93 pozycje, z których znaczna część to pozycje najnowsze z ostatnich dwu lub trzech lat, opublikowane w renomowanych międzynarodowych czasopismach z wysokim wskaźnikiem IF. Spis literatury zawiera także odwołania do normatywów prawnych krajowych oraz Unii Europejskiej.

Główny tekst pracy, będący w zasadzie rozbudowanym autoreferatem odnoszącym się do najważniejszych zagadnień opisanych we wspomnianych powyżej trzech publikacjach, zawiera wszystkie standardowe elementy rozprawy doktorskiej. Są to kolejno: streszczenie, wprowadzenie, cel rozprawy doktorskiej oraz hipotezy badawcze, materiał i metody, omówienie wyników zawartych w publikacjach wchodzących w skład doktoratu wraz z dyskusją oraz podsumowanie i wnioski.

Streszczenie pracy przedstawia przesłanki uzasadniające wybór tematu, definiuje przy tym pojęcia gospodarki cyrkulacyjnej, bioremediacji oraz tytułowej entomoremediacji, a także w skondensowanej formie opisuje trzy publikacje wchodzące w skład doktoratu. Wprowadzenie w jasny i klarowny sposób przybliżyła gospodarcze znaczenie owadów, odnosząc się przy tym do szeregu publikacji międzynarodowych oraz przywołując normatywy prawne – głównie rozporządzenia Unii Europejskiej.

W kolejnych podrozdziałach Doktorantka odwołując się do ważniejszych artykułów przybliżyła zagadnienia związane z entomoremediacją jako jednym ze sposobów wykorzystania owadów oraz przedstawia *Hermetia illucens* jako owada o rosnącym znaczeniu gospodarczym. Opisuje przy tym sposoby hodowli związane z wymaganiami żywymi i cyklem rozwoju, uzasadniając tym również zasadność wyboru tego gatunku do prowadzenia badań nad entomoremediacją. Wprowadzenie zakończone jest podrozdziałem charakteryzującym osady ściekowe jako uciążliwy odpad komunalny.

Głównym celem badań tożsamym z tytułem pracy doktorskiej była ocena możliwości wykorzystania *Hermetia illucens* w entomoremediacji osadów po oczyszczaniu ścieków komunalnych.

W ramach realizacji celu zasadniczego realizowane były prace zmierzające do osiągnięcia celów cząstkowych wyszczególnionych przez Doktorantkę jako:

C1. Ocena potencjału do bioakumulacji wybranych pierwiastków w organizmie *H. illucens* na różnych etapach jej rozwoju w warunkach optymalnych.

C2. Ocena możliwości wykorzystania osadu pofermentacyjnego po oczyszczaniu ścieków komunalnych jako substratu dla larw *H. illucens*.

C3. Ocena bioakumulacji pierwiastków występujących w osadzie pofermentacyjnym po oczyszczaniu ścieków komunalnych w organizmie *H. illucens* na różnych etapach jej rozwoju.

C4. Zaproponowanie nowej wielkości fizycznej opisującej bioakumulację w doświadczeniach laboratoryjnych, w których organizmy najpierw hodowane były na jednej karmie, a następnie przeniesione i hodowane na innej.

Cel główny oraz cele cząstkowe realizowane były w oparciu o weryfikację przyjętych hipotez badawczych wynikających z przeprowadzonych analiz literaturowych oraz doświadczeń zespołu badawczego, w którym pracowała Doktorantka:

H1. *H. illucens* akumuluje niektóre pierwiastki w swojej biomase podczas żerowania na karmie zawierającej te pierwiastki.

H2. Stężenia zakumulowanych pierwiastków mogą być różne w larwach, poczwarkach, wylinkach i imago.

H3. W przypadku gdy *H. illucens* nie akumuluje danego pierwiastka, to jego stężenie po żerowaniu larw zwiększy się w pozostałości ze względu na utylizację materii organicznej przez larwy.

H4. Larwy *H. illucens* są w stanie przeżyć żywiąc się prefermentowanym osadem po procesie oczyszczania ścieków, przez co mogą zredukować jego ilość i zakumulować niektóre pierwiastki w nim zawarte.

H5. W momencie przygotowania organizmu do właściwego doświadczenia następuje akumulacja różnych pierwiastków występujących w karmie używanej na tym etapie.

W rozdziale dotyczącym materiału i metod Doktorantka przedstawia hodowlę mateczną *H. illucens* z której pozyskano larwy do prowadzonych doświadczeń oraz sposób przygotowania wystandaryzowanych larw, jak również karmę wykorzystywaną w eksperymencie. W dalszej kolejności dokładnie scharakteryzowane zostały wykorzystane w badaniach prefermentowane osady ściekowe pochodzące z Miejskiej Oczyszczalni Ścieków w Lublinie oraz takie same osady wzbogacone karmą.

Kolejny podrozdział zawiera opis układu eksperymentalnego – zastosowanej procedury oraz użytego sprzętu i materiałów. Prezentując metody analityczne Doktorantka przedstawiła równania opisujące stopień utylizacji substratów, śmiertelność larw, wielkość bioakumulacji (BAF), czyli powszechnie stosowany w literaturze przedmiotu współczynnik zaproponowany przez Walkera, jak również bardzo ważną z punktu widzenia nowości oraz wagi naukowej dla doktoratu wielkość bioakumulacji (BAI). Opisana została także aparatura wykorzystywana do oznaczeń pierwiastków ICP–OES (iCAP Series 6500, Thermo Scientific, USA) wraz z podaniem długości fali oraz stosowanych wzorców wewnętrznych. W skrótowej formie opisana została także metodyka analizy statystycznej oraz użyte oprogramowanie.

W części zawierającej omówienie wyników przedstawione zostały rezultaty badań zamieszczonych w publikacjach wchodzących w skład doktoratu. Przedstawione w tym rozdziale wyniki bezpośrednio dotyczą celu zasadniczego doktoratu oraz celów cząstkowych.

Pierwszy podrozdział odnoszący się do pracy P1 stara się odpowiedzieć na pytanie badawcze, jakie pierwiastki mogą podlegać bioakumulacji w biomacie *H. illucens* oraz czy wspomniana bioakumulacja jest różna w zależności od stadium rozwoju badanych owadów. Główny akcent położony został na makro- i mikroelementy, wybrane metale ciężkie toksyczne oraz dodatkowo pierwiastki nieistotne fizjologicznie. Celem podrozdziału było również przedstawienie potencjału bioakumulacyjnego *H. illucens* ze źródła pokarmowego w warunkach, kiedy stężenie analizowanych pierwiastków jest niewielkie. W trakcie badań wykorzystywano karmę, która rutynowo stosowana była wcześniej w hodowli matecznej owadów. Prezentowane i dyskutowane w odniesieniu do literatury przedmiotu wyniki dotyczą utylizacji masy karmy, wzrostu biomasy i śmiertelności owadów, a także czasu przepoczwarczenia. Bardzo ważną część tego podrozdziału zawiera omówienie i dyskusję wyników związanych z bioakumulacją wspomnianych wcześniej pierwiastków. Podsumowując ten podrozdział można stwierdzić, że obejmuje on realizację celu opisanego jako C1 oraz potwierdza hipotezy oznaczone jako H1 i H2.

Drugi podrozdział odnosi się do pracy P2 i dotyczy bardzo ważnego z punktu widzenia osiągnięcia naukowego Doktorantki, czyli nowego podejścia do ilościowego określania bioakumulacji pierwiastków w procesach biologicznych. Podejście takie jest szczególnie istotne w trakcie prowadzenia eksperymentów laboratoryjnych, w których organizmy przenoszone są z hodowli matecznej, gdzie żerowały na innej karmie niż ta, która użyta zostanie we właściwym doświadczeniu. Podkreślając znaczenie zaproponowanego indeksu BAI, Doktorantka w wyważony sposób odniosła się także do powszechnie używanego wskaźnika BAF, wskazując celowość jego stosowania w ekosystemach, gdzie organizmy bytują przez całą długość swojego życia żerując na podobnym pokarmie. Za mocną stroną podrozdziału uważam klarowne opisanie znaczenia oraz różnic w koncepcji i interpretacji poszczególnych wartości progowych omawianych miar bioakumulacji (BAF i BAI).

Podrozdział dotyczący entomoremediacji komunalnych przefermentowanych osadów ściekowych przez *Hermetia illucens* z dodatkiem paszy optymalnej i bez niej został przedstawiony w bardziej szczegółowej formie od dwu poprzednich. Wynika to z faktu, iż powiązana z nim publikacja P3 w momencie przygotowania doktoratu była w fazie manuskryptu przesłanego do redakcji. Motywacją prezentowanych w nim badań był fakt, iż w krajowej i zagranicznej literaturze przedmiotu istnieje bardzo mało prac dotyczących wykorzystania ustabilizowanych beztlenowo komunalnych osadów ściekowych. Jest to zagadnienie o tyle istotne, że osady ściekowe mogą zawierać znaczne ilości metali ciężkich, a w takiej sytuacji ich wykorzystanie w rolnictwie lub rekultywacji środowiska jest ograniczone przepisami prawa. Stąd też ważnym problemem jest ocena możliwości wykorzystania wspomnianego osadu jako substratu dla larw *H. illucens* oraz sprawdzenie, czy dodatek optymalnej dla larw karmy (20% s.m.) zwiększa efektywność tego procesu. Dodatkowo ważnym celem cząstkowym tego podrozdziału było wykazanie zdolności *H. illucens*, będącej na różnych etapach swojego rozwoju, do bioakumulacji pierwiastków występujących w przefermentowanych osadach ściekowych. Prezentowane wyniki badań wskazują na wyraźne różnice w rozwoju larw żerujących na osadach ściekowych oraz mieszance osadów i karmy. Odnosiły się one zarówno do długości larw, przyrostu ich świeżej masy, jak i czasie przepoczwarczenia – nie nastąpiło ono nawet po 113 dniach przy żerowaniu na osadach, a podczas eksperymentu na osadach suplementowanych karmą już po 24 dniach. Bardzo wyraźna była także różnica w śmiertelności, która wynosiła ponad 23% w przypadku osadów i 14% w przypadku osadów suplementowanych. Przeanalizowane zostały w omawianym podrozdziale zmiany stężeń branych pod uwagę pierwiastków w substracie, a także ich stężenia w owadach – larwach, poczwarkach oraz wylinkach i imago. Ostatnia część wspomnianych badań zasługuje na szczególną uwagę, gdyż owady mogą wydalać toksyczne lub nadmiarowe pierwiastki do egzoszkieletu bądź też unieruchamiać je w postaci bogatych w metale granułów fosforanu wapnia. W świetle opisywanych badań oraz informacji z literatury przedmiotu traktować można wspomniane zjawisko jako entomoekstrakcję pierwiastków,

co w odniesieniu do wyników zawartych w podrozdziale dotyczy szczególnie Ag. W dalszej części podrozdziału Doktorantka odniosła się do wielkości bioakumulacji przedstawionej za pomocą BAF, BAI oraz porównania i interpretacji wyników uzyskanych za pomocą obu tych miar. Podrozdział zamyka podsumowanie i wnioski odnoszące się do pracy P3, w ramach której realizowane były cele cząstkowe C2 i C3 oraz potwierdzone zostały hipotezy H2, H3 i H4.

Całość pracy zamyka zestawienie końcowe podsumowujące wszystkie prezentowane badania i prezentujące wnioski wraz z przyporządkowaniem ich do poszczególnych prac (P1, P2 i P3) wchodzących w skład doktoratu. Pierwsze trzy wyszczególnione wnioski pochodzą z pracy P1 i odnoszą się do bioakumulacji pierwiastków przez *H. illucens*, a szczególności bioakumulacji metali ciężkich.

Czwarty wniosek dotyczy wielkości bioakumulacji opisywanej jako BAI, korygującej i pozwalającej na lepszą interpretację wniosków wynikających z klasycznej wielkości BAF i odnosi się do pracy P2.

Ostatnie trzy wnioski są szczególnie ciekawe z punktu widzenia gospodarki cyrkulacyjnej i stanowią przyczynek to praktycznej implementacji badań. Bazując na eksperymentach z wykorzystaniem prefermentowanych osadów ściekowych jako karmy *H. illucens* informują o redukcji poziomu suchej masy osadów, celowości stosowania dodatku niewielkiej ilości karmy oraz poziomu bioakumulacji analizowanych pierwiastków wyrażonego za pomocą BAF i BAI.

#### 4. Merytoryczna ocena rozprawy

Tematyka pracy jest oryginalna, aktualna i interesująca, ma także potencjał wdrożenia praktycznego w przyszłości. Praca jest napisana poprawnie oraz została podzielona na logicznie ułożone rozdziały, co wynika również z wykorzystania w niej informacji z wchodzących w jej skład publikacji. Na uwagę zasługuje zrealizowanie obszernego programu badań eksperymentalnych oraz wprowadzenie i odpowiednie zinterpretowanie, jak również uzasadnienie celowości i obszaru zastosowania nowej miary bioakumulacji BAI.

Za główne osiągnięcia Autorki pracy uważam:

- Ocenę możliwości bioakumulacji pierwiastków przez *H. illucens*, w szczególności metali ciężkich w poszczególnych stadiach rozwojowych owadów oraz bioakumulacji Ag w wylince, które to zjawisko uznać można za entomoe ekstrakcję tego pierwiastka.
- Wprowadzenie do literatury światowej wielkości bioakumulacji opisywanej jako BAI korygującej i pozwalającej na lepszą interpretację wniosków wynikających z klasycznej wielkości BAF w przypadku eksperymentów laboratoryjnych, w których organizmy przenoszone są z hodowli matecznej, gdzie żerowały na innej karmie niż ta, która użyta została w zasadniczej części doświadczenia.
- Ocenę możliwości entomoremediacji komunalnych prefermentowanych osadów ściekowych przez *Hermetia illucens* z dodatkiem paszy i bez niej, jak również wskazanie możliwych do wykorzystania jako suplementu bioodpadów z różnych gałęzi przemysłu.

#### 5. Uwagi dyskusyjne

W pracy dostrzec można niewielką liczbę błędów redakcyjnych. W dalszej części recenzji przedstawionych zostało kilka uwag, jakie nasunęły się podczas analizowania pracy, a które umożliwią dalszą dyskusję podczas publicznej obrony:

- Doktorantka wielokrotnie wspomina o karmie optymalnej, nie podaje jednak jej definicji ani źródła literaturowego definiującego to pojęcie. W takim przypadku spodziewać można się wielu parametrów branych pod uwagę, o których wspomina w pracy Doktorantka, np. długość larw, przyrost świeżej masy, śmiertelność, czas przepoczwarczenia, nie wspominając już o formalnym opisie funkcji celu itp. Podobnie na stronie 15 wspomniane są warunki optymalne hodowli, co należałoby doprecyzować. Zbliżona uwaga dotyczy stwierdzenia „o korzystnym profilu aminokwasowym” ze strony 16.
- Na stronie 5 Doktorantka wspomina o utylizacji osadu ściekowego, choć, zarówno w kontekście akapitu, w którym o tym pisze, jak i zagadnień związanych z gospodarką cyrkulacyjną, jest to raczej przeróbka, zagospodarowywanie czy też biokonwersja.
- Na stronie 11 wspomniane jest „powiązanie czynnikami”, choć czynniki raczej wpływają, a wiązą przywołane dalej zależności. Dalej Doktorantka pisze o produkcji owadów, podczas gdy bardziej odpowiednim byłoby słowo hodowla lub chów, bo produkcja raczej prowadzona jest przez owady, np. miód, jedwab, enzymy. Podobnie na stronie 16 pojawia się stwierdzenie „firm produkujących czy sprzedających owady”.
- Na stronie 14 w tytule podrozdziału użyto określenia „o coraz większym znaczeniu”, gdzie w tym miejscu może lepsze byłoby sformułowanie „rosnącym znaczeniu”.
- Przy opisie rys. 1 na stronie 15 wskazane byłoby przywołanie źródła literaturowego bądź źródeł, na podstawie których opracowany został schemat.
- Na stronie 34 Doktorantka wspomina o kilku sposobach stabilizacji osadów, ale jednak nie o wszystkich popularnych, które można wymienić. Wspomina także, że „zdecydowana większość komunalnych oczyszczalni ścieków jako etap stabilizacji wykorzystuje wydzielone komory fermentacyjne”, choć w tym stwierdzeniu brakuje informacji, z jakiej grupy takich oczyszczalni, bo ogólnie ani w przeszłości ani obecnie nie jest to prawdą.
- Ciekawym wątkiem analizy byłoby porównanie w przyszłości opisanej w C4 (str. 19) wielkości fizycznej opisującej bioakumulację w doświadczeniach laboratoryjnych do wieku osadu i zaszczepiania bioreaktorów z osadem czynnym w warunkach laboratoryjnych.
- Dwa bardzo ciekawe wątki zasygnalizowane w ramach pracy można byłoby dokładniej wyeksponować jako obiecujące kierunki badań na przyszłość, aby podkreślić, że rozpoczęte prace to w zasadzie początek obiecującej ścieżki badawczej z możliwą wartością zarówno poznawczą, jak i aplikacyjną. Jest to bioekstakcja Ag oraz wykorzystanie bioodpadów z różnych gałęzi przemysłu jako suplementu w przygotowaniu karmy dla owadów na bazie ustabilizowanych osadów ściekowych.

## 6. Podsumowanie i wniosek końcowy

W podsumowaniu chciałbym podkreślić, że dobrze oceniam przedstawioną do recenzji pracę doktorską. Na tę ocenę zasługuje zarówno teoretyczny, jak i doświadczalny wkład Doktorantki. Zamieszczone w recenzji uwagi mają charakter dyskusyjny, mają również wskazać przyszłe kierunki i możliwości badań oraz zachęcić do wyraźniejszego podkreślania praktycznych osiągnięć i możliwości zastosowania wyników badań. Uważam, że mgr Kinga Proc-Pietrycha rzetelnie przeanalizowała oryginalny problem naukowy mający istotne znaczenie w dyscyplinie naukowej rolnictwo i ogrodnictwo, który został jasno sformułowany w przedłożonej rozprawie doktorskiej pt. „Ocena

możliwości wykorzystania *Hermetia Illucens* w entomoremediacji osadów po oczyszczaniu ścieków komunalnych”.

W swojej pracy Doktorantka zamieściła informacje zarówno z zakresu technologii hodowli zwierząt (owadów), oczyszczania ścieków i przeróbki osadów ściekowych, planowania działań przydatnych przy remediacji w obrębie gospodarki cyrkulacyjnej, jak i instrumentalnych metod analitycznych. Wykazała się umiejętnością planowania eksperymentu i prowadzenia pracy naukowej.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca mgr Kinga Proc-Pietrycha spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez obowiązujące przepisy. Wnoszę o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Gniewar Żygóń