

# Załącznik

nr 3a

Autoreferat w języku polskim

dr inż. Olga Marta Marchut-Mikołajczyk



Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Politechnika Łódzka

**AUTOREFERAT**

Z opisem dorobku i osiągnięć naukowych  
związanych z postępowaniem habilitacyjnym

**Biodegradacja wybranych zanieczyszczeń organicznych z  
wykorzystaniem innowacyjnych technik bioremediacji oraz  
mikroorganizmów wyizolowanych ze skażonego środowiska**

Łódź, 2019

## Spis treści

1. Dane personalne .....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej .....	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	4
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) .....	4
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego .....	4
4.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego .....	4
4.3. Omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania .....	6
4.3.1. Wprowadzenie.....	7
4.3.2. Cel badań.....	9
4.3.3. Szczegółowe omówienie wyników badań.....	11
5. Literatura .....	30
6. Podsumowanie obszarów badawczych niewchodzących w skład osiągnięcia naukowego: ....	33
7. Podsumowanie.....	39
8. Sumaryczne zestawienie dorobku naukowego .....	44

## 1. Dane personalne

### Imię i Nazwisko

Olga Marta Marchut-Mikołajczyk

### Miejsce pracy

Politechnika Łódzka, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Instytut Biochemii Technicznej

Dane kontaktowe: 42 6313352

e-mail: [olga.marchut-mikolajczyk@p.lodz.pl](mailto:olga.marchut-mikolajczyk@p.lodz.pl)

## 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

**2004 r. – Magister inżynier**, kierunek Biotechnologia (studia stacjonarne, 5-letnie, magisterskie), Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka.

**2008 r. - Certyfikat Audytora Systemu Zarządzania Środowiskowego wg ISO 14001**, Podyplomowe Studium Auditingu Ekologicznego, Uniwersytet Gdański, Wydział Zarządzania.

**2010 r. – Doktor nauk technicznych, specjalność biotechnologia**, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka. Tytuł rozprawy doktorskiej: *Zastosowanie enzymów związanych z mycelium *Mucor circinelloides* w procesie biodegradacji ropy naftowej*-promotor: prof. dr hab. Tadeusz Antczak.

**2014 r. – Menedżer projektu badawczo-rozwojowego**, Studia Podyplomowe, Wyższa Szkoła Bankowa w Chorzowie, oddział w Łodzi, Wydział Administracji.

### 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 2004 - 2010**     **Studia doktoranckie** na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechniki Łódzkiej.
- 2010 - 2011**     **Asystent** w Instytucie Biochemii Technicznej, na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechniki Łódzkiej.
- 2011- obecnie**   **Adiunkt** w Instytucie Biochemii Technicznej, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka.

### 4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.)

#### 4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

**Biodegradacja wybranych zanieczyszczeń organicznych z wykorzystaniem innowacyjnych technik bioremediacji oraz mikroorganizmów wyizolowanych ze skażonego środowiska.**

#### 4.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Lista publikacji naukowych, stanowiących podstawę do wniosku (Autor/autorzy, tytuł publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa) w kolejności chronologicznej

*Opis indywidualnego wkładu habilitanta w powstanie każdej z wieloautorskich publikacji znajduje się w Załączniku 5 (Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki).*

**H1 Marchut-Mikołajczyk\* O. (80%), Kwapisz E. (10%), Antczak T. (10%),**  
*Enzymatyczna bioremediacja ksenobiotyków, Inżynieria I Ochrona Środowiska, 2013, 1.16 (1), 39-55.*

**MSWiN (B)= 5**

**H2 Marchut-Mikołajczyk\* O. (70%),** Kwapisz E. (15%), Wieczorek D. (5%), Antczak T. (10%), *Biodegradation of diesel oil hydrocarbons enhanced with *Mucor circinelloides* enzyme preparation*, International Biodeterioration & Biodegradation 2015, Vol 104, 142-148, doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.05.008.

**MSWiN= 30, IF<sub>2015</sub> =2,429 (5-letni IF=3,631)**

**H3 Marchut-Mikołajczyk\* O. (65%),** Polewczyk A. (25%), Antczak T. (10%), *Innowacyjne techniki wspomagania procesów bioremediacji gleby zanieczyszczonej związkami ropopochodnymi w Innowacyjne rozwiązania rewitalizacji terenów zdegradowanych*, REVITARE, 2015, T7, 87-96 ISBN: 9788393954414 (rozdział w monografii).

**MSWiN = 4**

**H4 Wieczorek\* D. (40%), Marchut-Mikołajczyk O. (45%),** Strzelecki B.,(5%), Gajewska M. (2,5%), Polewczyk A.(2,5%), Antczak T (5%). *The effect of tertbutylhydroquinone (TBHQ) on biodiesel bioremediation in soil samples inoculated with bacterial cells*, International Biodeterioration&Biodegradation2016,Vol.115,205-211, doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.08.016

**MSWiN=30, IF<sub>2016</sub> =2,962 (5 -letni IF=3,631)**

**H5 Marchut-Mikołajczyk\*, O. (70%),** Drożdżyński, P. (20%), Pietrzyk, D. (5%), Antczak T. (5%), *Biosurfactant production and hydrocarbon degradation activity of endophytic bacteria isolated from *Chelidonium majus* L.* Microbial Cell Factories, 2018 17:171, doi.org/10.1186/s12934-018-1017-5,

**MSWiN=40, IF<sub>2018</sub> =3,831 (5-letni IF=4,295)**

**H6 Marchut-Mikołajczyk \*O. (65%),** Drożdżyński P. (20%), Domański J. (5%), Januszkiewicz B. (5%), Wrześniewska-Tosik K. (5%), *Degradation of ozonized tire rubber by aniline-degrading *Candida methanosorbosa* BP6 strain*, Journal of Hazardous Materials, 2019, 5;367:8-14, doi: 10.1016/j.jhazmat.2018.12.045

**MSWiN=45, IF<sub>2019</sub>= 6,434 (5-letni IF=6,513)**

#### **Patenty:**

**H7 Polewczyk A. (35%), Marchut-Mikołajczyk O. (35 %),** Kwapisz E. (10 %), Antczak T. (10%), Bielecki S. (5 %), Smigielski K. (5%), 2012. **Patent RP 222382.** *Sposób otrzymywania preparatu enzymów wspomagającego bioremediację środowiska*

*zanieczyszczonego węglowodorami ciężkiej frakcji ropy naftowej oraz sposób bioremediacji gleby zanieczyszczonej ciężką frakcją ropy naftowej.*

**MSWiN= 30**

**H8** Śmigielski K. (30%), **Marchut-Mikołajczyk O. (30%)**, Polewczyk A. (30%), Antczak T. (10%), 2013. **Patent RP 222395**. Sposób bioremediacji środowiska wodnego zanieczyszczonego olejem napędowym, 2013.

**MSWiN=30**

*Oświadczenia wszystkich współautorów określające wkład w powstanie poszczególnych publikacji znajdują się w **Załączniku nr 6**.*

#### **4.3. Omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

Podstawą wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego jest cykl 6 oryginalnych artykułów naukowych opublikowanych w latach 2013-2019 oraz 2 patentów. Cztery artykuły zostały opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR), jedna praca przeglądowa została opublikowana w czasopiśmie z listy B MSWiN, oraz jeden artykuł został opublikowany jako rozdział w monografii. Sumaryczny Impact Factor (zgodnie z rokiem wydania) publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego według bazy Journal Citation Reports (JCR) wynosi **15,656**; 5-letni Impact Factor wynosi **18,070**; zaś sumaryczna liczba punktów według MNiSW (zgodnie z rokiem wydania) wraz z punktacją patentową wynosi **214**.

Publikacje łączy tematyka obejmująca biodegradację wybranych zanieczyszczeń organicznych. Opracowanie skutecznych metod wspomagających procesy mikrobiologicznego rozkładu zanieczyszczeń jak również pozyskanie ze skażonych środowisk drobnoustrojów wykazujących wysoką aktywność degradacyjną posłużą do opracowania nowych bądź udoskonalania już istniejących technologii oczyszczania środowiska.

### 4.3.1. Wprowadzenie

*(wykaz cytowanych publikacji podano w rozdziale 5 Autoreferatu)*

Obecny stan zanieczyszczenia środowiska, w świetle wielu katastrof ekologicznych i ogromnych ilości powstających odpadów, stanowi jeden z najpoważniejszych problemów ekologicznych współczesnego świata. Szybki rozwój przemysłu przyczynił się do powstania różnorodnych paliw, rozpuszczalników, farb i tworzyw sztucznych, takich jak guma, będących mieszaniną różnego typu związków organicznych, wśród których największą grupę stanowią węglowodory (alifatyczne związki nasycone i nienasycone, związki cykliczne i aromatyczne). Niektóre z tych związków charakteryzują się wysoką toksycznością i trwałością, a w konsekwencji opornością na biodegradację. Pojawienie się w środowisku produktów będących mieszaniną różnych grup węglowodorów stanowi zagrożenie dla ekosystemów [Goyal i Basniwal, 2017].

Podatność zanieczyszczenia na rozkład jest uzależniona od szeregu czynników związanych z jego budową chemiczną, własnościami fizyko-chemicznymi, stężeniem w środowisku oraz warunkami panującymi w miejscu skażenia. Związek organiczny uznawany jest za oporny na degradację, gdy jego rozkład prowadzony przez mikroflorę obecną w miejscu skażenia trwa o wiele dłużej niż w przypadku większości naturalnych substratów. Związki te nazwano ksenobiotykami, gdyż są one nowe bądź nieznane dla mikroflory autochtonicznej [Suthersan, 1999]. Ksenobiotyki postrzegane są jako związki niewystępujące lub rzadko występujące w naturze, bądź też zawierające w swej budowie elementy, które nie mogą być syntetyzowane na drodze biochemicznej. W przeciwieństwie do naturalnie występujących substancji organicznych, które stosunkowo łatwo podlegają rozkładowi w środowisku naturalnym, niektóre z syntetycznych związków organicznych są odporne na biodegradację. Jednakże części badaczy używa terminu „ksenobiotyk” również w odniesieniu do związków występujących w naturze, jednak pojawiających się w środowisku w stężeniu znacznie przekraczającym to, w którym występują naturalnie. Takie zjawisko obserwuje się na przykład przy wycieku oleju, ściekach przemysłowych czy też składowiskach odpadów niebezpiecznych [Rieger i współ., 2002; Knapp i Bromley-Challoner, 2003; Croom, 2012].

Jednym z głównych celów biotechnologii w odniesieniu do ochrony środowiska jest opracowanie procesów biologicznych pozwalających na skuteczną utylizację zanieczyszczeń i poprawę stanu środowiska naturalnego. W tym aspekcie duże znaczenie ma wykorzystanie technik bioremediacyjnych jako efektywnych strategii oczyszczania środowiska, znajdujących zastosowanie zarówno do usuwania zanieczyszczeń substancjami naturalnymi,



jak i tymi pochodzenia antropogenicznego. Bioremediacja wykorzystuje aktywność degradacyjną mikroorganizmów, których systemy enzymatyczne wykazują właściwość przekształcania toksycznych związków organicznych w składniki mniej toksyczne lub całkowicie nieszkodliwe dla środowiska, jak dwutlenek węgla i woda [Goyal i Basniwal, 2017].

Pomimo, iż bioremediacja jest postrzegana jako efektywna i nie wymagająca dużych nakładów inwestycyjnych metoda usuwania zanieczyszczeń ze środowiska, wadą tej technologii jest długi czas trwania procesów biodegradacji. W zależności od rodzaju i stężenia zanieczyszczenia procesy biologicznego oczyszczania trwają od kilkunastu miesięcy do kilku lat. Dodatkowo, poważnym problemem, wpływającym na wydłużenie bioremediacji, jest usuwanie tzw. zanieczyszczeń resztkowych - najtrudniej degradable. Dlatego też, w celu zwiększenia szybkości rozkładu zanieczyszczeń konieczne jest zastosowanie dodatkowych, racjonalnych technik wspomagających.

Najistotniejszym elementem biologicznych metod oczyszczania są biopreparaty służące do efektywnej degradacji zanieczyszczeń. Podstawą do ich opracowania jest pozyskanie ze skażonego środowiska mikroorganizmów wykazujących wysoką aktywność degradacyjną wobec zanieczyszczenia. Namnożenie i wprowadzenie do skażonego środowiska biopreparatów opartych na mikroflorze autochtonicznej nie tylko pozwala na efektywne oczyszczenie środowiska, ale również na zachowanie równowagi w ekosystemie [Goyal i Basniwal, 2017].

Niestety, obserwowana akumulacja toksycznych substancji w środowisku wskazuje, iż mimo ewolucji, drobnoustroje w obecności dużej ilości różnych związków, w tym ksenobiotyków nie były w stanie wykształcić wielu szlaków metabolicznych, umożliwiających szerokie wykorzystywanie tych substancji jako źródła węgla i energii. Należy zatem zwrócić uwagę na możliwość zastosowania technik umożliwiających zwiększenie skuteczności mikrobiologicznej degradacji zanieczyszczeń.

Uwzględniając złożoność systemów, jakimi są zanieczyszczone grunty czy zbiorniki wodne, należy zwrócić uwagę na możliwość wykorzystania w procesach biodegradacji nie tylko potencjału metabolicznego mikroorganizmów, ale i samych enzymów (w formie preparatów), zarówno tych wydzielanych poza komórkę, jak i enzymów wewnątrzkomórkowych. Bioremediacja enzymatyczna stanowi bardzo dobre narzędzie służące wspomaganie usuwania ze środowiska konkretnych, opornych na degradację zanieczyszczeń. Z punktu widzenia procesów biotransformacji opornych na rozkład

związków szczególnie skuteczne wydaje się zastosowanie grzybowych, wieloenzymowych preparatów [Alcade i współ., 2006; Piotrowska-Długosz, 2017].

Innym rozwiązaniem, przyczyniającym się do zwiększenia efektywności usuwania zanieczyszczeń ze środowiska jest zastosowanie metod chemicznych. Większość skażeń środowiska powodują substancje stabilne chemicznie, co znacznie utrudnia proces ich biologicznego utleniania. Przeprowadzenie wstępnego utlenienia zanieczyszczeń z użyciem utleniaczy chemicznych (odczynnik Fentona, nadtlenek wodoru, ozon) może uczynić je łatwiej przyswajalnymi dla mikroorganizmów. Jednakże warunki procesu należy dobrać w taki sposób, by nie wpływały one negatywnie na mikroflorę bytującą w skażonym środowisku. Zastosowanie ozonowania, jako czynnika utleniającego wykorzystywane jest głównie do oczyszczania ścieków zawierających znaczne ilości związków opornych na degradację. Metoda ta może również stanowić skuteczne i stosunkowo najmniej inwazyjne narzędzie do intensyfikacji procesów bioremediacji [Krosowiak i współ., 2008, Chen i współ., 2016].

W związku z potrzebą zwiększenia efektywności usuwania zanieczyszczeń organicznych ze środowiska najskuteczniejszym rozwiązaniem wydaje się być stosowanie technik łączących aktywność degradacyjną mikroorganizmów z bioremediacją enzymatyczną lub też obejmujących wykorzystanie wstępnego utleniania zanieczyszczenia z degradacją mikrobiologiczną.

#### **4.3.2. Cel badań**

Badania związane z procesami biodegradacji prowadzone są w Instytucie Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej (IBT PŁ) od ponad 25 lat (Kwapisz i współ., 2008; Romanowska i współ. 2010). Wyniki tych badań, kierowanych przez dr inż. Ewę Kwapisz zostały praktycznie wykorzystane w trakcie realizacji grantu rozwojowego (NR 14-0027-04), realizowanego we współpracy z firmą Poszukiwania Nafty i Gazu, Sp. z o.o., w latach 2007-2010. Celem projektu było przeprowadzenie bioremediacji gruntu zanieczyszczonego ropą naftową na terenach po odwiertach ropy naftowej, zlokalizowanych na Podkarpaciu. Do oczyszczania środowiska wykorzystano opracowane w IBT, PŁ biopreparaty w formie konsorcjów bakteryjnych, oparte na mikroorganizmach wykazujących aktywność degradacyjną. W skład biopreparatów wchodziły szczepy bakterii z gatunku *Gordonia alkanivorans*, *Pseudomonas putida* i *Bacillus* sp. Zastosowanie wyżej wymienionych

mikroorganizmów do bioremediacji było przedmiotem dwóch patentów (Patent RP 205688, 2005; Patent RP 205687, 2005).

Pomimo opracowania biopreparatów opartych na mikroorganizmach wykazujących aktywność degradacyjną, proces oczyszczania terenów po odwiertach ropy naftowej trwał dwa i pół roku. Szczególnie trudne okazało się usuwanie najbardziej opornych na degradację związków obecnych w skażonych gruncie, w tym węglowodorów aromatycznych, stanowiących tzw. zanieczyszczenia resztkowe. Tak długi czas trwania bioremediacji zwiększa koszty prowadzenia procesu, związane między innymi z koniecznością kilkukrotnej aplikacji biopreparatu do oczyszczanego środowiska.

W toku badań wykonywanych w ramach pracy doktorskiej, pod kierunkiem prof. dr hab. Tadeusza Antczaka i opieką dr inż. Ewy Kwapisz, prowadziłam badania nad możliwością zastosowania enzymów związanych z mycelium *Mucor circinelloides*, jako czynnika wspomagającego biodegradację ropy naftowej. Badany przeze mnie preparat, otrzymany w zespole prof. Antczaka do rozkładu tłuszczów odpadowych, charakteryzował się wysoką aktywnością lipazy (3,75 U/mg) i niską aktywnością lakazy (0,12 U/mg). Metoda wspomagania biodegradacji ropy naftowej tym preparatem, została odznaczona złotym medalem, na II Międzynarodowej Wystawie Wynalazków, IWIS 2008.

Możliwość uczestniczenia w badaniach związanych z realizacją grantu rozwojowego (NR 14-0027-04) i obserwowanie problemów pojawiających się w trakcie prowadzenia bioremediacji (pozyskiwanie mikroorganizmów o wysokiej aktywności degradacyjnej, utrudniony rozkład zanieczyszczeń będących mieszaniną różnych grup związków, konieczność kilkukrotnego wprowadzania biopreparatu do środowiska, związana z obniżającą się aktywnością metaboliczną drobnoustrojów spowodowaną zmianami warunków atmosferycznych i zmniejszającą się dostępnością trudniej degradowalnych zanieczyszczeń), a także coraz większa ilość doniesień literaturowych na temat trudności w opracowaniu skutecznych metod biotechnologicznych usuwania węglowodorowych zanieczyszczeń i odpadów zwróciła moja uwagę na potrzebę doskonalenia technik bioremediacyjnych poprzez wzbogacenie ich o nowe narzędzia o wysokim potencjale aplikacyjnym.

Celem prezentowanego cyklu publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego było: **(1) opracowanie innowacyjnych technik bioremediacji i ich wykorzystanie do usuwania ze środowiska wybranych zanieczyszczeń organicznych oraz (2) ocena aktywności degradacyjnej mikroorganizmów izolowanych ze skażonego środowiska wobec zanieczyszczeń obecnych w miejscu izolacji.**

### 4.3.3. Szczegółowe omówienie wyników badań

Bioremediacja stanowi jedną z najbardziej efektywnych technologii usuwania zanieczyszczeń. Pomimo szeregu zalet tej technologii, poważnym problemem, wpływającym na wydłużenie procesów oczyszczania środowiska nawet do kilku lat, jest usuwanie najbardziej opornych na degradację zanieczyszczeń. Powyższe problemy badawcze, skłoniły mnie do przeprowadzenia badań mających na celu opracowanie efektywnych, innowacyjnych technik bioremediacji ksenobiotyków opartych na połączeniu mikrobiologicznej degradacji z bioremediacją enzymatyczną (**H1, H2, H3, H7**) lub/i wstępnym utlenianiem ozonem (**H3, H8**).

Zagadnienia związane z rolą enzymów w procesach biodegradacji podejmowane w toku realizacji pracy doktorskiej skłoniły mnie do pogłębienia wiedzy z zakresu wykorzystania enzymów w biotechnologii środowiska. Pozyskana wiedza pozwoliła mi na przygotowanie pracy przeglądowej (**H1**), której przedmiotem było przedstawienie możliwości wykorzystania wybranych grzybowych enzymów z klasy oksydoreduktaz i hydrolaz do usuwania ze środowiska ksenobiotyków, takich jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, polichlorowane bifenyle, pochodne fenolu czy dioksyny. Znaczną część pracy poświęciłam enzymom pochodzącym z grzybów białej zgnilizny (*Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*), charakteryzujących się wysokim potencjałem do efektywnego rozkładu ksenobiotyków. Omówiłam możliwości zastosowania enzymów z klasy oksydoreduktaz, takich jak: lakaza (EC1.10.3.2), Mn-peroksydaza (EC1.11.1.13) czy peroksydaza ligninowa (EC1.11.1.14) do usuwania ksenobiotyków ze środowiska. W pracy poruszyłam również zagadnienia związane z rolą lipaz (EC 3.1.1.3) w bioremediacji. Enzymy te uznawane są za dobry biochemiczny wskaźnik postępu mikrobiologicznej degradacji zanieczyszczeń w glebie, ze szczególnym uwzględnieniem degradacji związków ropopochodnych [Margesin i współ., 2000, Alcade i współ., 2006]. Jednakże ich właściwości katalityczne wskazują, iż możliwe jest także zastosowanie lipaz do podniesienia wydajności usuwania ftalanów ze środowiska wodnego [Mita et al., 2010].

W pracy **H1** zwróciłam uwagę na fakt, iż możliwość wykorzystania enzymów w bioremediacji wymaga rozwoju metod produkcji odpowiednich preparatów enzymatycznych, przeznaczonych specjalnie do tych celów, a więc również niedrogich. Podkreśliłam zalety zastosowania enzymów do oczyszczania środowiska. W porównaniu z typową remediacją mikrobiologiczną enzymy wykazują wyższą aktywność względem opornych na degradację

polutantów przy jednoczesnej niskiej wrażliwości na zmiany ich stężeń. Ponadto aplikacja preparatów enzymatycznych nie wymaga tak szczegółowej kontroli jak w przypadku celowych preparatów mikrobiologicznych (pH, stosunek C:N:P, stężenie tlenu, wilgotność). Zwróciłam również uwagę na wady zastosowania tej techniki. W perspektywie aplikacji dostępnych na rynku preparatów enzymatycznych (zawierających pojedyncze enzymy) w bioremediacji prowadzonej *in situ*, koszty oczyszczania czyniłyby tę technikę drogą i nieopłacalną. Dla przykładu, koszt zakupu preparatu lakazy z *Trametes versicolor*, firmy Sigma-Aldrich wynosi ok. 400 złotych za 1 g preparatu. Zasugerowałam, iż rozwiązaniem tego problemu mogłoby być opracowanie metod otrzymywania wieloenzymowych preparatów enzymatycznych, zawierających białka katalityczne ukierunkowane na rozkład konkretnych zanieczyszczeń. Znajomość szlaków degradacji związków wchodzących w skład skażenia dostarcza informacji na temat enzymów katalizujących poszczególne etapy rozkładu. Szczególnie istotna jest obecność w preparacie enzymów inicjujących rozkład zanieczyszczeń (enzymy z klasy oksydoreduktaz, w tym monooksygenazy i dioksygenazy) jak również tych katalizujących końcowe etapy biodegradacji (enzymy z klasy hydrolaz, w tym esterazy (lipazy)). Wykorzystanie do otrzymywania preparatów enzymatycznych surowców odpadowych i tańszych metod hodowli (np. solid state fermentation), może uczynić bioremediację enzymatyczną nie tylko skutecznym ale i ekonomicznym narzędziem biotechnologicznym wspomagającym proces oczyszczania środowiska.

Opisany w pracy H1 duży potencjał enzymów do usuwania ksenobiotyków ze środowiska skłonił mnie do przeprowadzenia badań mających na celu otrzymanie wieloenzymowego preparatu enzymatycznego, ukierunkowanego na rozkład węglowodorów. Wyniki uzyskane w pracy doktorskiej wskazały, że grzyb z gatunku *Mucor circinelloides* wytwarza enzymy (głównie lipazy), które mogą mieć potencjalne zastosowanie w biodegradacji. Jednakże preparat badany przeze mnie w ramach pracy doktorskiej był preparatem otrzymanym w celu hydrolizy tłuszczów odpadowych i, oprócz lipazy, wykazywał jedynie śladową aktywność lakazy. Chcąc uzyskać preparat wykazujący aktywność enzymów niezbędnych do katalizowania reakcji rozkładu węglowodorów postanowiłam zmienić warunki procesu otrzymywania preparatu enzymatycznego z grzyba *Mucor circinelloides*. Modyfikacja składu podłoża hodowlanego za pomocą węglowodorowego substratu, stwarzała możliwość pozyskania preparatu wzbogaconego o nowe enzymy przydatne w procesie biotransformacji związków ropopochodnych. Opracowałam metodę otrzymywania preparatu z *Mucor circinelloides* pozwalającą na uzyskanie zestawu enzymów niezbędnych do przeprowadzenia efektywnej biotransformacji

składników oleju napędowego. W tym celu przeprowadziłam aktywację metabolizmu badanego grzyba na rozkład oleju napędowego poprzez indukcję polegającą na naniesieniu sterylnego paliwa na skos agarowy zawierający 72 h biomasę szczepu *Mucor circinelloides*. Skosy inkubowałam przez kolejne 24 godziny, w temperaturze 30°C. Indukcję powtarzałam trzykrotnie. Następnie wysterylizowane podłoże hodowlane do biosyntezy enzymów szczepiłam zawiesiną zarodników szczepu *Mucor circinelloides*, uprzednio aktywowanego na rozkład oleju napędowego. Po 72 godzinnej hodowli węgłowej grzybnię przesączono na filtrze celulozowym, przemyto wodą i odtłuszczono/odwodniono acetonem, według metody opisanej przez Antczaka i współpracowników [Antczak i współ., 1995]. Po wysuszeniu grzybni w temperaturze pokojowej i zmieleniu w młynku udarowym do wielkości drobin 2-5 µm otrzymałam surowy preparat enzymatyczny. Według Szczęsnej-Antczak i współpracowników, preparaty pozyskiwane z grzybów strzępkowych z rodzaju *Mucor*, cechuje wysoka aktywność lipolityczna (400-800 µmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>), związana z obecnością wewnątrzkomórkowych lipaz [Szczęsna-Antczak i współ., 2006]. Zastosowanie indukcji pozwoliło na otrzymanie wieloenzymowego preparatu *Mucor circinelloides*, wykazującego aktywność lipazy (3,15 U/mg), lakazy (1,74 U/mg), Mn-peroksydazy (1,15 U/mg) oraz 1,2- i 2,3- dioksygenazy katecholowej (odpowiednio 0,95 U/mg i 0,76 U/mg). Wykorzystanie otrzymanego przeze mnie preparatu w biodegradacji oleju napędowego zostało opisane w pracy **H2**. Proces biodegradacji węglowodorów oleju napędowego, wspomaganą wieloenzymowym preparatem *Mucor circinelloides*, prowadziłam przez 14 dni w podłożu płynnym, w warunkach hodowli wstrząsanej. W badaniach wykorzystałam trzy szczepy bakterii, pochodzące z zasobów Instytutu Biochemii Technicznej: *Gordonia alkanivorans* S7 (wyizolowany ze ścieków petrochemicznych), *Achromobacter xylosoxidans* G21 (wyizolowany z gleby zanieczyszczonej mieszaniną oleju napędowego i biodiesla) i *Pseudomonas sp.* A34 (wyizolowany z ciężkiej frakcji destylacji ropy naftowej). Wszystkie szczepy bakterii charakteryzowała wysoka aktywność degradacyjna wobec węglowodorów. W badaniach zastosowałam wysokie stężenie oleju napędowego (7% v/v). Węglowodorowy substrat został poddany mikrobiologicznej degradacji z udziałem w/w szczepów bakterii. Dla każdego z wariantów mikrobiologicznego rozkładu oleju napędowego przygotowałam próbę odniesienia, w której proces biodegradacji wspomagałam nowym, wieloenzymowym preparatem z *M. circinelloides*. Analiza aktywności respiracyjnej i krytycznego stężenia tlenu wykazała, że wprowadzenie enzymów *Mucor circinelloides* do środowiska biodegradacji (w ilości 2 mg na 3 g węglowodorów), zwiększa metaboliczną aktywność drobnoustrojów prowadzących proces degradacji. Szybkość zużywania tlenu przez komórki bakterii w

próbach z dodatkiem wieloenzymowego preparatu *M. circinelloides* przez cały czas trwania procesu biodegradacji była dwukrotnie wyższa niż w próbach bez badanego preparatu. Ponadto, wartości krytycznego stężenia tlenu w próbach zasilonych preparatem enzymatycznym były o 30% niższe, w porównaniu z próbami bez dodatku preparatu. Wykazałam, że zastosowanie wieloenzymowego preparatu *M. circinelloides* wpływa nie tylko na podwyższenie aktywności metabolicznej mikroorganizmów prowadzących proces biodegradacji, ale także wydłuża ją w czasie. Zjawisko to wpływa bezpośrednio na efektywność biodegradacji. Ubytek zanieczyszczenia otrzymany po 14 dniach prowadzenia procesu w próbach bez dodatku badanego preparatu wynosił od 55 do 70%. Dodatek preparatu enzymatycznego spowodował wzrost ubytku zanieczyszczenia o ok 20-30%. W próbie, w której proces prowadzony przez szczep *G. alkanivorans* S7 został zasilony wieloenzymowym preparatem z *M. circinelloides*, po 14 dniach uzyskałam 86% efektywność biodegradacji ogólnej puli węglowodorów. Ponadto wprowadzenie wieloenzymowego preparatu do środowiska biodegradacji skutkowało zwiększeniem szybkości degradacji węglowodorów. Zjawisko to było szczególnie istotne w drugim tygodniu procesu, w którym w środowisku pozostają trudniej degradowalne węglowodory rozgałęzione i aromatyczne. W 10 dniu procesu wartość badanego parametru dla szczepu *G. alkanivorans* S7, w próbie zasilonej badanym preparatem wynosiła  $0.26 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , podczas gdy w próbie bez preparatu  $0,17 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Badania dotyczące rozkładu związków ropopochodnych zwykle prowadzone są przez 21 dni, a stężenie zanieczyszczenia w środowisku nie przekracza 5% v/v. Uzyskana przeze mnie efektywność biodegradacji wskazuje, że zastosowanie otrzymanego preparatu pozwala na skrócenie czasu trwania oczyszczania, nawet w obecności wysokiego stężenia zanieczyszczenia. Wykazałam również, że zastosowanie otrzymanego preparatu enzymatycznego powoduje zwiększenie ubytku węglowodorów aromatycznych w mieszaninie. Związki te należą do trudnodegradowalnych i często wchodzą w skład tzw. zanieczyszczeń resztkowych. Zastosowanie wieloenzymowego preparatu skutkowało 10% wzrostem ubytku węglowodorów aromatycznych, w porównaniu z próbami nie zasilonymi preparatem. Zjawisko to było związane z obecnością w preparacie takich enzymów jak lakaza i dioksygenazy katecholowe. Uzyskane wyniki wskazują, że w celu zwiększenia szybkości i efektywności biodegradacji zanieczyszczeń będących mieszaniną związków alifatycznych i aromatycznych warto stosować wspomaganie wieloenzymowymi preparatami, zawierającymi enzymy uczestniczące w biotransformacjach grup związków wchodzących w skład tego zanieczyszczenia. Utlenianie n-alkanów prowadzi do powstawania homologicznych kwasów tłuszczowych lub alkoholi i powstania z tych substratów estrów. Kwasy tłuszczowe,

otrzymane w wyniku hydrolizy enzymatycznej estrów katalizowanej przez esterazy (lipazy), w końcowym etapie rozkładu węglowodorów są degradowane na drodze  $\beta$ -oksydacji [Margesin i współ., 1999]. Wprowadzenie do środowiska preparatów wykazujących aktywność lipazy może przyczyniać się do wzrostu stężenia wolnych kwasów tłuszczowych w środowisku. Związki te mogą pełnić również rolę surfaktantów, zwiększających dostępność hydrofobowych substratów dla komórek mikroorganizmów, co potwierdzają uzyskane dwukrotnie wyższe wartości aktywności emulgacyjnej w próbach zasilonych badanym preparatem enzymatycznym. Dane te wskazują na ważną rolę lipaz w procesach biodegradacji związków ropopochodnych.

**W pracy H2, wykazałam, iż w celu zwiększania efektywności mikrobiologicznego rozkładu mieszanin węglowodorów należy stosować wieloenzymowe preparaty, zawierające enzymy uczestniczące w biotransformacjach grup związków wchodzących w skład tego zanieczyszczenia.**

Kontynuując badania nad opracowaniem metod zwiększających efektywność bioremediacji postanowiłam ocenić możliwość zastosowania czynników biologicznych (grzybowe preparaty enzymatyczne) i chemicznych (ozonowany olej roślinny) do zwiększenia efektywności biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w glebie. Wyniki tych badań opisałam w pracy H3. Przeprowadziłam proces bioremediacji gleby w warunkach laboratoryjnych, symulując warunki oczyszczania *in situ*. Zanieczyszczoną olejem napędowym w stężeniu 8% v/w glebę poddałam 40-dniowemu procesowi oczyszczania z wykorzystaniem biopreparatu złożonego z dwóch szczepów bakterii: *Gordonia alkanivorans* S7 (wyizolowany ze ścieków petrochemicznych) i *Bacillus mycoides* NS1020 (wyizolowany z gleby zanieczyszczonej ropą naftową), znajdujących się w zasobach IBT, PŁ. Do usprawnienia procesu mikrobiologicznego oczyszczania wykorzystałam dwie techniki. W wariacie pierwszym proces bioremediacji wspomagałam poprzez wprowadzenie do oczyszczanej gleby, w 15 dobie procesu, wieloenzymowego preparatu *Mucor circinelloides* (aktywowanego na rozkład oleju napędowego, opisanego w pracy H2), w opracowanej przeze mnie dawce 1mg preparatu na 1 g substancji ropopochodnych. W wariacie drugim, wprowadzałam do gleby ozonowany olej roślinny w stężeniu 50g/kg gleby w pierwszej dobie oczyszczania. Technika ta została opracowana we współpracy z zespołem Prof. dr hab. Krzysztofa Śmigielskiego, z Instytutu Podstaw Chemii Żywności, PŁ. Próbę odniesienia stanowiła zanieczyszczona gleba, w której proces bioremediacji prowadzony był z udziałem biopreparatu złożonego z obu szczepów, bez stosowania technik wspomagających. Proces



oczyszczania monitorowałam poprzez analizę parametrów fizyko-chemicznych (pH, ubytek zanieczyszczenia) oraz biologicznych (aktywność dehydrogenaz i lipaz glebowych).

Ustaliłam, iż zastosowanie obu badanych technik pozwala na blisko 40% zwiększenie efektywności degradacji zanieczyszczeń, w porównaniu z efektywnością bioremediacji prowadzonej jedynie z udziałem drobnoustrojów. W 40 dobie procesu dla próby wspomaganej wieloenzymowym preparatem *Mucor circinelloides* uzyskałam 88% efektywność procesu bioremediacji a dla próby wspomaganej ozonowanym olejem roślinnym - 82%. Ciekawym zjawiskiem, były różnice w efektywności usuwania zanieczyszczeń pomiędzy próbami oznaczone w 20 dobie procesu. Zastosowanie wstępnego utleniania zanieczyszczenia poprzez wprowadzenie ozonowanego oleju roślinnego pozwoliło na 62% ubytek węglowodorów, podczas gdy w próbie z dodatkiem preparatu enzymatycznego uzyskałam 49% ubytek zanieczyszczenia. Analizując rolę zastosowanych technik w zwiększeniu efektywności bioremediacji, wykazałam, że zarówno wprowadzenie preparatu enzymatycznego jak i ozonowanego oleju roślinnego wpływa na poprawę kondycji metabolicznej mikroorganizmów prowadzących proces oczyszczania. Najwyższą aktywność dehydrogenaz glebowych uzyskałam w 20 dobie procesu. W próbie wspomaganej ozonowanym olejem roślinnym aktywność badanego parametru wynosiła  $54 \mu\text{molTPF g}^{-1}\text{h}^{-1}$  zaś w próbie zasilonej preparatem enzymatycznym *Mucor circinelloides*  $52 \mu\text{molTPF g}^{-1}\text{h}^{-1}$ . W 40 dobie bioremediacji odnotowałam znaczący spadek aktywności metabolicznej drobnoustrojów we wszystkich próbach, co jest wynikiem wyczerpywania się łatwo przyswajalnych składników zanieczyszczenia. Najwyższą aktywność dehydrogenaz glebowych w 40 dobie procesu -  $35 \mu\text{molTPF g}^{-1}\text{h}^{-1}$  odnotowałam w próbie zasilonej preparatem enzymatycznym. Analiza zmian aktywności lipaz glebowych w trakcie bioremediacji, dostarczyła mi informacji na temat intensywności procesów biodegradacji zachodzących w środowisku. Najwyższe wartości tego parametru zaobserwowałam w 30 i 40 dobie procesu, w próbach, w których zastosowałam wstępne utlenienie zanieczyszczenia ozonowanym olejem roślinnym, odpowiednio  $1,6 \mu\text{molTPF g}^{-1}\text{h}^{-1}$  i  $1,23 \mu\text{molTPF g}^{-1}\text{h}^{-1}$ . Przy czym, należy podkreślić, że wyższa aktywność lipaz oznaczona w glebie zasilonej preparatem enzymatycznym, może być związana z obecnością lipaz w tym preparacie. Analizując przebieg całego procesu bioremediacji zauważyłam, że wprowadzenie ozonowanego oleju roślinnego do gleby, poprzedzające właściwy proces mikrobiologicznego rozkładu zanieczyszczenia pozwoliło na wstępne utlenienie węglowodorów i zwiększenie efektywności pierwszej fazy biodegradacji. Z kolei zastosowanie wieloenzymowego preparatu *Mucor circinelloides* preparatu enzymatycznego pozwala, zwiększyć aktywność

metaboliczną drobnoustrojów prowadzących proces oczyszczania, co jest szczególnie istotne w końcowej fazie procesu, gdy w środowisku obecne są trudnodegradowalne zanieczyszczenia. **Wykazałam, że dobór techniki wspomagającej jest ściśle związany z fazą procesu bioremediacji, której efektywność wymaga zwiększenia.** Chcąc zwiększyć podatność zanieczyszczeń na rozkład mikrobiologiczny poprzez przekształcenie ich w związki łatwiej przyswajalne, należy zastosować wstępne utlenienie. W przypadku konieczności usprawnienia usuwania pozostałości po rozkładzie mikrobiologicznym, należy zastosować preparaty enzymatyczne w celu „doczyszczenia” co umożliwi obniżenie poziomu opornie biodegradowalnych składników aromatycznych zalegających w środowisku. Opracowany przeze mnie wieloenzymowy preparat jest znacznie tańszy niż dostępne handlowo preparaty enzymatyczne. Koszt jego wyprodukowania, w warunkach laboratoryjnych, to ok 10 złotych za 1 g produktu. Przy wytwarzaniu na dużą skalę koszt produkcji preparatu może ulec obniżeniu. Technika wspomagająca oparta na wykorzystaniu preparatu enzymatycznego jest również bezodpadowa, gdyż enzymy ulegają degradacji w środowisku i możliwa do zastosowania w miejscu wystąpienia skażenia. Z kolei wykorzystanie ozonowanego oleju roślinnego, mimo wysokiej efektywności bioremediacji niesie za sobą konieczność wprowadzenia dodatkowych związków chemicznych do środowiska. Ponadto, ozon wprowadzony do środowiska może wykazywać działanie bójcze w stosunku do mikroflory autochtonicznej, obecnej w miejscu skażenia. Dlatego też, technika ta może być stosowana do wspomagania bioremediacji *ex situ* lub oczyszczania środowiska wodnego.

Przeprowadzone przeze mnie badania nad zastosowaniem bioremediacji enzymatycznej oraz wstępnego utleniania z wykorzystaniem ozonowanego oleju roślinnego, jako innowacyjnych technik wspomagania procesów bioremediacji pozwoliły na przygotowanie dwóch patentów (**H7**, **H8**), obejmujących techniki usuwania ze środowiska takich zanieczyszczeń jak ciężka frakcja ropy naftowej-P31 i olej napędowy. W pracy **H7** opisano sposób otrzymywania wieloenzymowego preparatu otrzymanego z grzyba strzępkowego *Aspergillus niger* IBT-150, znajdującego się w zasobach Instytutu Biochemii Technicznej, PŁ oraz jego zastosowanie do wspomagania mikrobiologicznej degradacji ciężkiej frakcji ropy naftowej P31. Wykazano, iż zastosowanie preparatu enzymatycznego z *A. niger* IBT-150 do wspomagania bioremediacji gleby zanieczyszczonej frakcją P31 pozwala na wyraźne zwiększenie efektywności procesu oczyszczania. W próbach bioremediacji prowadzonej wyłącznie z udziałem bakterii odnotowano o 15-20% mniejszy ubytek ogólnej puli zanieczyszczeń. W przypadku biodegradacji węglowodorów frakcji P31 w środowisku

płynnym, wprowadzenie badanego preparatu enzymów pozwalało na 20% wzrost efektywności mikrobiologicznego rozkładu, już po 14 dniach procesu oczyszczania.

Z kolei w pracy **H8** opisano sposób bioremediacji gleby zanieczyszczonej olejem napędowym, wspomaganą poprzez wprowadzenie do oczyszczanego środowiska ozonowanego oleju roślinnego. Wykazano, iż użycie w procesie bioremediacji kultur bakterii łącznie z olejem roślinnym poddanym procesowi ozonowania umożliwia zwiększenie wydajności biodegradacji o ok 20-30%, w porównaniu z wydajnością bioremediacji prowadzonej jedynie z udziałem kultur bakterii.

Uzyskane wyniki badań przedstawione w pracach stanowiących osiągnięcie habilitacyjne były także podstawą do przygotowania projektu „Nowoczesna technologia bioremediacji gruntów zanieczyszczonych olejem krezotowym na terenie Nasycalni Podkładów w Koźminie Wielkopolskim” (POIR 04.01.02-00-0057.17), który otrzymał finansowanie z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju i jest realizowany od maja 2018 roku. Projekt ten realizowany jest przez konsorcjum, w skład którego wchodzi Instytut Technologii Drewna w Poznaniu, Politechnika Poznańska, Politechnika Łódzka oraz Nasycalnia Podkładów S.A., w Koźminie Wielkopolskim. Koordynatorem projektu jest Pani Profesor J. Zabielska, z Instytutu Technologii Drewna w Poznaniu. Przedmiotem projektu jest opracowanie technologii bioremediacji gleby zanieczyszczonej olejem krezotowym. Olej krezotowy jest produktem otrzymywanym ze smoły węglowej, używanym do impregnacji drewna. Produkt ten to mieszanina węglowodorów, w skład której wchodzi głównie mono- i wielopierścieniowe węglowodory. Budowa i właściwości składników oleju krezotowego czynią go toksycznym i trudnodegradowalnym zanieczyszczeniem. Dlatego niezbędne jest opracowanie technologii bioremediacji dedykowanej usunięciu oleju krezotowego ze środowiska. W projekcie pełnię rolę Kierownika B+R zadań realizowanych na Politechnice Łódzkiej. Zadania te obejmują badania przemysłowe, dotyczące przeprowadzenia analiz biochemicznych miejsca skażenia; skryningu grzybowych preparatów enzymatycznych oraz drobnoustrojów, celem opracowania biopreparatu do efektywnego usuwania zanieczyszczenia ze środowiska jak również opracowania metody bioremediacji skażonego terenu, która zostanie zastosowana in situ, na terenie Nasycalni Podkładów S.A w Koźminie Wielkopolskim, do usunięcia oleju krezotowego. W ramach prac rozwojowych, w trakcie prowadzenia bioremediacji skażonego terenu Politechnika Łódzka będzie odpowiedzialna za monitorowanie parametrów biochemicznych i mikrobiologicznych, wpływających na efektywność oczyszczania. Realizowane w ramach projektu badania nie tylko pozwolą na opracowanie technologii bioremediacji dedykowanej terenom skażonym olejem

kreozotowym, ale również pozwolą na poszerzenie wiedzy na temat aktywności degradacyjnej mikroorganizmów wyizolowanych z gruntu skażonego olejem kreozotowym.

Podstawowym narzędziem technik bioremediacyjnych są mikrobiologiczne biopreparaty. Najbogatszym źródłem drobnoustrojów charakteryzujących się aktywnością degradacyjną jest zanieczyszczone środowisko. Biopreparaty oparte na mikroflorze autochtonicznej nie tylko pozwalają na efektywne oczyszczenie środowiska, ale również na zachowanie równowagi w ekosystemie [Goyal i Basniwal, 2017]. Moje zainteresowania związane z doskonaleniem technik bioremediacji sprawiły, iż równoległe z badaniami nad opracowaniem metod pozwalających na zwiększenie efektywności rozkładu ksenobiotyków prowadziłam badania nad aktywnością degradacyjną mikroorganizmów, izolowanych ze skażonego środowiska wobec zanieczyszczeń obecnych w miejscu izolacji.

Wyniki badań związanych z oceną aktywności degradacyjnej mikroorganizmów izolowanych z terenów zanieczyszczonych wobec zanieczyszczeń obecnych w miejscu izolacji przedstawiłam w pracach **H4**, **H5** i **H6**. Potrzeba poszukiwania nowych rozwiązań w zakresie poprawy stanu środowiska naturalnego skłoniły mnie do poszerzenia badań nad procesami biodegradacji różnego typu zanieczyszczeń organicznych, od biopaliwa typu biodiesel, poprzez olej napędowy, przepracowany olej silnikowy aż po odpadową gumę z opon samochodowych. W badaniach wykorzystałam bakterie wyizolowane z gleby zanieczyszczonej węglowodorami i estrami wyższych kwasów tłuszczowych (**H4**); endofityczne bakterie wyizolowane z jaskółczego ziela (*Chellidonium majus* L.) rosnącego na terenach zanieczyszczonych związkami ropopochodnymi (**H5**) oraz szczep drożdży *Candida methanosorbosa* BP6, wyizolowany z zanieczyszczonych aniliną terenów nieczynnej fabryki Boruta w Zgierzu (**H6**).

Duży nacisk na komercjalizację mieszanek biodiesla/oleju napędowego (B5, B7) sprawił, iż zaistniało ryzyko pojawienia się w środowisku nowego typu zanieczyszczeń. Przedostanie się tego nowego typu paliwa do środowiska, na skutek niekontrolowanych wycieków powstałych podczas transportu i eksploatacji niosło za sobą ryzyko wywołania trudnych do oszacowania szkód w środowisku. Ryzyko to zwiększał również fakt niestabilności właściwości fizyko-chemicznych biodiesla i konieczność uzupełniania składu tego paliwa o specjalne dodatki uszlachetniające (detergencyjne, antykorozyjne, przeciwutleniające) [Sunar i współ., 2014]. Dodawane do paliw typu biodiesel antyoksydanty mogą wykazywać aktywność przeciwdrobnoustrojową, negatywnie wpływając na efektywność oczyszczania środowiska oraz na obecną w nim mikroflorę. Zjawisko to

zainicjowało potrzebę badań nad biodegradowalnością tego typu paliw, jak również opracowania skutecznych metod usuwania ich ze środowiska [Gutierrez-Larraínzar et al., 2013]. Problem ten opisałam w pracy **H4**. W podjętych badaniach przeprowadzony został proces mikrobiologicznej degradacji paliwa typu biodiesel. Szczepy bakterii zastosowane w badaniach zostały wybrane na podstawie wyników skriningu, który przeprowadziłam z wykorzystaniem 20 szczepów bakterii, znajdujących się w zasobach IBT, PŁ, wyizolowanych z różnych środowisk zanieczyszczonych paliwami. Aktywność degradacyjną badanych szczepów wobec biodiesla potwierdziłam za pomocą techniki opartej na wskaźniku redoks – 2,6-dichlorofenylo-indofenolu (DCPIP) [Soares i współ., 2009]. Spośród badanych szczepów jedynie bakterie z gatunku *Sarcina spp.* i *Achromobacter xylosoxidans* G21 po 12 i 18 godzinach inkubacji w temperaturze 30°C prawie całkowicie odbarwiały pożywkę hodowlaną. Na podstawie uzyskanych wyników szczepy te zostały wybrane do dalszych badań związanych z biodegradacją biodiesla. Szczep *Sarcina spp* pochodził z gleby zanieczyszczonej mieszaniną oleju napędowego i biodiesla, zaś szczep *Achromobacter xylosoxidans* G21 był pozyskany z gleby zanieczyszczonej olejem napędowym. Przeprowadzony został 60 dniowy proces bioremediacji gleby zanieczyszczonej biodieslem w ilości 5% w/w, z użyciem inokulum szczepów *Sarcina spp.* oraz *Achromobacter xylosoxidans* G21, symulując proces bioremediacji *in situ*. W przeprowadzonych badaniach określono również wpływ tert-butylo-hydrochinonu (TBHQ) – jednego z najczęściej stosowanych do paliwa typu biodiesel związku przeciwutleniającego, na proces mikrobiologicznego rozkładu biodiesla w glebie. Proces bioremediacji oceniano na podstawie zmian aktywności dehydrogenaz i esteraz glebowych, stężenia FFA (wolnych kwasów tłuszczowych) oraz kiełkowania i wczesnego wzrostu roślin, przy użyciu testu Phytotoxkit®. Wykazałam, iż bioaugmentacja zanieczyszczonej gleby prowadzona z użyciem szczepów *Sarcina spp.* jak i *Achromobacter xylosoxidans* G21 pozwala na niemal całkowite usunięcie biodiesla z gleby. Najwyższą efektywność degradacji biodiesla zaobserwowałam po 60 dniach procesu (odpowiednio 98% i 99% ubytek zanieczyszczenia). Wprowadzenie do biodiesla przeciwutleniacza - TBHQ, w przypadku obu szczepów skutkowało obniżeniem efektywności biodegradacji o ok. 10-15%. Należy jednak zauważyć, iż w próbach kontrolnych, w których proces bioremediacji prowadzony był jedynie z użyciem mikroflory autochtonicznej, uzyskano obniżenie początkowego stężenia zanieczyszczenia o 75-81%, bez względu na obecność TBHQ. Zjawisko to wynikało z wysokiej aktywności metabolicznej rodzimej populacji drobnoustrojów względem estrów wyższych kwasów tłuszczowych obecnych w środowisku. Tym samym uzyskałam wyniki potwierdzające tezę, że

mikroorganizmy izolowane z zanieczyszczonego środowiska cechuje aktywność degradacyjna względem zanieczyszczenia obecnego w miejscu skażenia. Wykazano również, iż stosowane do zwiększenia trwałości paliw typu biodiesel antyoksydanty wpływają hamująco na aktywność esteraz i dehydrogenaz glebowych, w rezultacie obniżając skuteczność biodegradacji. Wyniki analizy fitotoksyczności, wykonane przy użyciu testu Phytotoxkit®, z użyciem roślin wskaźnikowych (*Lepidium sativum* L- pieprzycy siewnej; *Sorghum saccharatum* -sorgo; *Sinapis alba*-gorczyca biała) potwierdziły negatywny wpływ przeciwutleniacza (TBHQ) na wzrost korzeni roślin. Fitotoksyczność we wszystkich próbkach gleby była bardzo wysoka do końca degradacji biodiesla, niezależnie od wariantu warunków bioremediacji (z lub bez TBHQ), a procent zahamowania wzrostu korzeni osiągnął  $84 \pm 2,7 - 93 \pm 1,8\%$ . Mimo, że obecność przeciwutleniacza w paliwie wpływała na obniżenie aktywności metabolicznej mikroorganizmów prowadzących proces degradacji to nie miała ona znaczącego wpływu na poziom fitotoksyczności. Wysoki procent zahamowania wzrostu korzeni roślin wskaźnikowych, obserwowany we wszystkich wariantach bioremediacji, wynikał ze wzrastającej podczas biodegradacji biodiesla kwasowości środowiska. Zjawisko to jest związane ze wzrastającym stężeniem wolnych kwasów tłuszczowych w środowisku, będących produktami rozkładu estrów metyloowych kwasów tłuszczowych. W 60 dniu procesu, we wszystkich inokulowanych próbkach gleby odnotowałam wysokie stężenie wolnych kwasów tłuszczowych ( $198 - 200 \mu\text{mol l g}^{-1}$ ).

**W pracy H4 po raz pierwszy zwrócono uwagę na fakt, iż pomimo uznawania paliw typu biodiesel za łatwiej biodegradowalne w porównaniu z konwencjonalnymi paliwami naftowymi, podczas jego degradacji mogą powstawać produkty negatywnie oddziałujące na środowisko. Stosowane w celu zwiększenia stabilności biodiesla antyoksydanty obniżają jego biodegradowalność wpływając na aktywność metaboliczną mikroorganizmów.**

Jedną z metod wykorzystywanych do usuwania zanieczyszczeń ze środowiska jest fitoremediacja. Technika ta wykorzystuje rośliny do pobierania ze skażonego środowiska kontaminantów. Organizmy roślinne mogą pobierać z zanieczyszczonego otoczenia związki organiczne poprzez system korzeniowy lub aparaty szparkowe obecne w liściach. Degradacja tych związków następuje poprzez reakcje utlenienia i redukcji prowadzone przez rośliny lub poprzez bytujące we wnętrzu ich tkanek endofity [Nair i Padmavathy, 2014]

Kontynuując badania nad pozyskiwaniem ze środowiska naturalnego mikroorganizmów o wysokim potencjale degradacyjnym zwróciłam uwagę na możliwość zbadania pod tym kątem

mikroorganizmów endofitycznych. Endofity są bakteryjnymi lub grzybowymi mikroorganizmami, kolonizującymi w tkankach roślin, nie powodującymi swoją obecnością żadnych widocznych negatywnych skutków dla gospodarza [Bacon i White, 2000]. Drobnoustroje te uważa się za najbardziej obiecujące źródło substancji aktywnych biologicznie. Dane literaturowe wskazują, iż do tej pory z każdej przebadanej pod kątem ich obecności rośliny gospodarza udało się wyizolować przynajmniej jeden gatunek endofitu. Jednakże, biorąc pod uwagę ogromną ilość gatunków roślin, do chwili obecnej, niewiele z nich zostało zbadanych pod kątem poszukiwania endofitycznych mikroorganizmów [Backman i Sikora, 2008; Nair i Padmavathy, 2014]. Wskazuje to na bogaty materiał wciąż czekający na zbadanie i pozwala przewidywać duże możliwości jego praktycznych zastosowań.

Mikroorganizmy endofityczne mogą zwiększać tolerancję gospodarza na stres związany z obecnością polutantów w środowisku jak i degradować pobrane zanieczyszczenie wewnątrz rośliny. Podczas fitoremediacji związków organicznych endofityczne mikroorganizmy produkują różne enzymy, których działanie zmniejsza fitotoksyczność i ewapotranspirację lotnych związków organicznych. Ponadto dzięki zdolności do promowania wzrostu gospodarza roślinnego stale rozwijają jego aktywność fitodegradacyjną. Endofity cechuje wysoki potencjał do prowadzenia procesów biotransformacji oraz zdolność do przekształcania złożonych związków, pozwalające im przetrwać i rozmnażać się nawet w niesprzyjających warunkach środowiska (Zikmundova et al. 2002). Niezmiernie interesujący wydał mi się fakt, iż spośród grup roślin analizowanych pod kątem obecności mikroorganizmów endofitycznych, aż 18% stanowiły te wzrastające w specyficznych warunkach, w tym w zanieczyszczonych środowiskach [Yu i współ., 2010]. Wiadomo, że obecność w środowisku mieszanin zawierających w swoim składzie parafiny, cykloalkany i węglowodory aromatyczne, może wpływać hamująco nie tylko na wzrost i aktywność metaboliczną mikroorganizmów ale również oddziaływać negatywnie na wzrost roślin. W warunkach stresu środowiskowego, jakim jest obecność tego typu zanieczyszczeń w środowisku, rośliny czerpią korzyści z interakcji z bytującymi w ich przestrzeniach tkankowych endofitami. Proces wzrostu roślin w obecności niebezpiecznych związków niejednokrotnie wymaga neutralizacji zanieczyszczenia. Mikroorganizmy endofityczne często produkują wtórne metabolity, które mogą między innymi promować wzrost roślin i zwiększać ich odporność na stresujące warunki środowiska. Mogą również wykazywać aktywność degradacyjną lub detoksyfikacyjną wobec zanieczyszczeń organicznych [Afzal et al., 2014; Mishra et al., 2016]. Dane te skłoniły mnie do podjęcia badań związanych z oceną aktywności degradacyjnych mikroorganizmów endofitycznych,

pozyskanych w roślin rosnących na terenach zanieczyszczonych. Moje zainteresowanie wzbudziła możliwość pozyskania mikroorganizmów endofitycznych z roślin synantropijnych, które cechuje zdolność do wzrostu w środowiskach charakteryzujących się silną antropopresją. Sprawia to, iż mogą one stanowić potencjalne źródło endofitów wykazujących zdolność do degradacji ksenobiotyków. Badania, związane z aktywnością degradacyjną oraz zdolnością do produkcji biosurfaktantów endofitycznych bakterii wyizolowanych, z jaskółczego ziela (*Chelidonium majus* L.), pobranego z terenów zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi opisałam w pracy **H5**. Materiał do badań stanowiło jaskółcze ziele *Chelidonium majus* L., pobrane z terenów przy autostradzie A1, w pobliżu Strykowa. Pobranie roślin ze środowiska, w którym były one narażone na zanieczyszczenia produktami spalania paliw i lotnymi węglowodorami stwarzało możliwość pozyskania mikroorganizmów endofitycznych wykazujących aktywność degradacyjną wobec tego rodzaju związków. Zdrowe części rośliny (korzenie, łodygi i liście) umyte wodą wodociągową, poddano sterylizacji powierzchniowej. Opracowane przeze mnie warunki procesu sterylizacji: 70% etanol - 3 minuty, 1% podchloryn sodu - 12 minut, 70% etanol - 30 sekund, 5-krotne przemycie sterylną wodą, pozwoliły mi na wyizolowanie z materiału roślinnego 10 szczepów endofitycznych bakterii. Następnie przeprowadziłam badania mające na celu określenie aktywności degradacyjnej izolatów wobec dwóch rodzajów zanieczyszczeń: oleju napędowego i przepracowanego oleju silnikowego. Wykazałam, iż większość z wyizolowanych endofitów charakteryzuje się wysoką aktywnością degradacyjną względem węglowodorów obecnych w oleju napędowym. Efektywność rozkładu oleju napędowego po 10 dniach procesu biodegradacji mieściła się w granicach 68,47% - 98,02%, przy czym najwyższy ubytek zanieczyszczenia wykazano dla endofitu określonego symbolem 2A. W badaniach dotyczących endofitycznej biodegradacji przepracowanego oleju silnikowego uzyskano niższe wartości ubytku węglowodorów, od 38,79% do 92,81%. Należy zauważyć, iż najwyższą efektywność rozkładu składników przepracowanego oleju silnikowego wykazano, tak jak w przypadku oleju napędowego, dla szczepu oznaczonego symbolem 2A. Pomimo, iż wykorzystanie endofitów do degradacji związków ropopochodnych było już opisywane w literaturze [Lori i współ., 2008; Stępniewska i Kuźniar, 2013; Pawlik i współ., 2017], **badania, które opisałam w pracy H5, są pierwszymi przedstawiającymi degradacyjną aktywność bakterii endofitycznych wyizolowanych z synantropijnej rośliny *Chelidonium majus* L., rosnącej na terenach zanieczyszczonych węglowodorami.** Mimo dostępnych danych literaturowych na temat obecności mikroorganizmów endofitycznych w tej roślinie, nie określono dotychczas ich aktywności degradacyjnej [Goryluk i współ., 2009]. Przeprowadzono analizę przynależności



taksonomicznej bakterii endofitycznej oznaczonej symbolem 2A. Filogenetyczna analiza podjednostki 16S rDNA, oraz wykonane testy biochemiczne i badania fizjologiczne wykazały, iż endofit oznaczony symbolem 2A wykazuje 99,8% podobieństwa do gatunku *Bacillus pumilus*. Jako, że efektywność biodegradacji w dużym stopniu uzależniona jest od biodostępności zanieczyszczenia, w swoich badaniach postanowiłam określić również zdolność wyizolowanych mikroorganizmów endofitycznych do produkcji biosurfaktantów. W przypadku hydrofobowych związków organicznych, na zwiększenie ich dostępności dla drobnoustrojów wpływa obecność biosurfaktantów. Biosurfaktanty są biodegradowalnymi, nietoksycznymi związkami powierzchniowo czynnymi, wytwarzanymi przez mikroorganizmy [Bustamante i współ., 2012]. Zdolność drobnoustroju do produkcji biosurfaktantów przyczynia się do zwiększania efektywności procesów biodegradacji. Zjawisko to czyni biologiczne związki powierzchniowo-czynne ważnymi również z punktu widzenia interakcji między roślinami i drobnoustrojami, zwłaszcza w ryzosferze, gdzie mogą zwiększyć biodostępność związków hydrofobowych dla roślin [Ron i Rosenberg., 2011]. Ma to szczególne znaczenie w przypadku roślin rosnących na obszarach zanieczyszczonych węglowodorami. Ponadto biosurfaktanty mogą również wykazywać aktywność przeciwdrobnoustrojową, co czyni je potencjalnie użytecznymi w eliminacji patogenów roślinnych, pośrednio wpływając na promocję wzrostu roślin [Liu i współ., 2010].

Oznaczenia zdolności wyizolowanych endofitów do produkcji biosurfaktantów wykonano w oparciu o analizę aktywności emulgacyjnej oraz indeksu emulsji w płynach hodowlanych otrzymanych po 10 dniowym procesie biodegradacji. Zauważyłam, że wszystkie badane endofity wykazują aktywność emulgacyjną, co świadczy o ich zdolności do produkcji biosurfaktantów. Jednakże dla poszczególnych szczepów zaobserwowałam różne wartości badanego parametru, w zależności od zastosowanego jako źródło węgla zanieczyszczenia. Najbardziej efektywnym producentem biosurfaktantów okazał się szczep oznaczony symbolem 2A (*Bacillus pumilus*), dla którego wartości aktywności emulgacyjnej w podłożu z dodatkiem oleju napędowego wyniosły  $OD_{500}$  1,96 a w podłożu z dodatkiem przepracowanego oleju silnikowego  $OD_{500}$  1,2. Również najbardziej stabilną emulsję (E24 65%) uzyskano dla szczepu *Bacillus pumilus* 2A. Uzyskane wyniki sugerują, iż składniki przepracowanego oleju silnikowego, takie jak: związki metali ciężkich, związku chloru czy wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne mogą wpływać na obniżenie aktywności degradacyjnej oraz zdolności do produkcji biosurfaktantów badanego endofitu. W oparciu o analizę białek (metodą Bradforda), cukrów (metodą Dubois) i składników lipidowych z wykorzystaniem chromatografii cienkowarstwowej (TLC) wykonano wstępną analizę

budowy biosurfaktantu. Na podstawie uzyskanych wyników pozyskany biosurfaktant zaklasyfikowano do glikolipidów. Wysoki potencjał degradacyjny endofitycznego szczepu *Bacillus pumilus* 2A względem węglowodorów może być powiązany z faktem, iż szczep ten został wyizolowany z rośliny wzrastającej w środowisku narażonym na zanieczyszczenie związkami ropopochodnymi. Wyniki przeprowadzonych badań sugerują również, iż szczep ten może być wykorzystany do oczyszczania środowiska z substancji ropopochodnych.

**Otrzymane wyniki były pierwszymi potwierdzającymi możliwość wykorzystania endofitycznego szczepu bakterii *Bacillus pumilus* do degradacji związków ropopochodnych.**

Biosurfaktanty, ułatwiając eksport zanieczyszczeń z fazy stałej umożliwiają drobnoustrojom zaadsorbowanym na cząstkach gleby dostęp do molekuł stanowiących zanieczyszczenie. Tym samym, poprzez zwiększenie biodostępności związków hydrofobowych dla drobnoustrojów zamieszkujących ryzosferę rośliny związki te mogą pośrednio sprzyjać jej wzrostowi [Khan et al., 2015]. Wykazana wysoka zdolność szczepu *Bacillus pumilus* 2A do produkcji substancji powierzchniowo czynnych skłoniła mnie do sprawdzenia możliwości zastosowania wyizolowanego biosurfaktantu jako czynnika promującego wzrost roślin. Przeprowadzono badania z użyciem testu Phytotoxkit®, mające na celu ocenę wpływu biosurfaktantu na kiełkowanie i wzrost roślin w glebie zanieczyszczonej olejem napędowym lub przepracowanym olejem silnikowym. Do tego celu wykorzystano nasiona roślin wskaźnikowych *Sorghum saccharatum* (sorgo), *Synapis alba* (gorczyca biała) i *Lepidium sativum* (pieprzyca siewna). Pozytywny wpływ obecności biosurfaktantu zaobserwowano dla wszystkich badanych roślin wskaźnikowych. W porównaniu z próbą kontrolną najwyższą stymulację kiełkowania nasion uzyskano dla gorzycy białej - 137% w glebie zanieczyszczonej olejem napędowym i 120% w glebie zanieczyszczonej przepracowanym olejem silnikowym.

**W pracy H5 po raz pierwszy wykazałam możliwość wykorzystania biosurfaktantów pozyskanych z mikroorganizmów endofitycznych jako czynników promujących wzrost roślin wzrastających w zanieczyszczonym środowisku.**

W roku 2011 rozpoczęłam współpracę naukowo-badawczą z Panią dr hab. inż. Krystyną Wrześniewską-Tosik, prof. IBWCh, z Instytutu Biopolimerów i Włókien Chemicznych w Łodzi. Badania obejmowały opracowanie metody zagospodarowania opornych na degradację odpadów kordów oponiarskich, dostarczonych przez firmę Orzeł S.A. Efektem badań było wykorzystanie odpadowych kordów oponiarskich jako sorbentów służących do usuwania związków ropopochodnych ze środowiska. Jednakże wykorzystanie

kordów oponiarskich jako sorbentu czyniło ten odpad jeszcze bardziej opornym na degradację. Dlatego, pomimo uzyskanych dobrych właściwości sorpcyjnych badanego materiału opracowany produkt nie mógł zostać skomercjalizowany. Najistotniejszym problemem w degradacji kordów oponiarskich była oporność gumowych składników odpadu na rozkład. Do tej pory nie opracowano efektywnych metod usuwania odpadów gumowych ze środowiska. Dlatego też postanowiłam podjąć próbę opracowania efektywnej biodegradacji tego typu zanieczyszczeń, ze szczególnym uwzględnieniem gumy z odpadowych opon. Odpad ten charakteryzuje się złożonym składem, obejmującym gumę (około 60 %), stal (około 20 %), włókno (około 20 %) oraz inne materiały i dodatki, takie jak przeciwutleniacze, które chronią materiał gumowy przed degradacją i utlenianiem. Ze względu na ich ilość i trwałość oraz obecność przeciwutleniaczy, zużyte opony są uciążliwe i trudne do pozbycia się. Potwierdzają to dane wskazujące, iż ponad 77% zużytych opon samochodowych nie jest w żaden sposób usuwane ze środowiska [Yikmis and Steinbuchel, 2012]. Problem badawczy ujęty w pracy **H6** dotyczył rozkładu odpadowej gumy z opon przez degradujący anilinę szczep drożdży *Candida methanosorbosa* BP-6. Anilina jest jednym ze związków przeciwutleniających stosowanych do zwiększenia odporności gumy na degradację. Stężenie tego przeciwutleniacza w zużytych oponach jest dość wysokie i często osiąga granicę wykrywalności, która wynosi  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  [Liu et al., 2012; Juan et al., 2018]. Wykorzystany w badaniach szczep drożdży *Candida methanosorbosa* BP-6, wyizolowany został w Instytucie Biochemii Technicznej, Politechniki Łódzkiej ze ścieków z obecnie nieczynnej fabryki barwników "Boruta" w Zgierzu (Polska), w której jednym z podstawowych surowców była anilina. Szczep ten cechuje zdolność do wzrostu w obecności wysokich stężeń aniliny (1-4%) oraz wysoka efektywność degradacji tego związku *Candida methanosorbosa* BP-6 (do 63%) [Mucha et al., 2010]. W publikacji **H6** określono zdolność szczepu *Candida methanosorbosa* BP-6 do rozkładu odpadowej gumy z opon, poddanej bądź nie poddanej wstępnej obróbce chemicznej ozonem. Do tej pory ozon stosowany był jako środek do modyfikacji powierzchni i funkcjonalizacji odpadów gumowych [Fan i Lu, 2012]. **Jako pierwsza opisałam połączenie wstępnego utleniania ozonem z mikrobiologiczną degradacją gumy.** Proces ozonowania gumy z wykorzystaniem generatora ozonu (BMT 803 N, BMT Messtechnik, Berlin) zoptymalizowano we współpracy z Instytutem Podstaw Chemii Żywności, PŁ, z wykorzystaniem metody Taguchi, optymalizując takie parametry jak: ilość gumy, czas ozonowania, stężenie ozonu. Gumę poddaną procesowi ozonowania w optymalnych warunkach oraz gumę nie poddaną procesowi ozonowania poddawano następnie 21 dniowemu procesowi biodegradacji z udziałem badanego szczepu drożdży, w warunkach

hodowli wstrząsanej. Aktywność degradacyjną szczepu wobec odpadu gumowego oceniano na podstawie aktywności respiracyjnej, aktywności emulgacyjnej, stężenia białka i stężenia aldehydów powstających w wyniku rozkładu materiału gumowego, z wykorzystaniem odczynnika Schiff'a. Ponadto stopień mikrobiologicznego rozkładu gumy oceniano na podstawie ubytku masy, analizy metodą spektrometrii w podczerwieni (FTIR) oraz skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). Wykazano, że badany szczep drożdży cechuje zdolność do wzrostu w obecności odpadu gumowego, stosowanego jako jedyne źródło węgla. Jednakże najwyższy wzrost tych drożdży, oznaczony pośrednio poprzez analizę stężenia białka ( $486 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), odnotowano dla prób zawierających ozonowaną gumę. Analizę zużycia tlenu w komórkach drożdży w obecności materiału gumowego wykorzystano do oceny metabolicznej aktywności szczepu. Najwyższą aktywność oddechową –  $5,62 [\text{mgO}_2 \text{l} \cdot \text{min}^{-1}]$ , odnotowano w obecności ozonowanego materiału gumowego w 6 dniu biodegradacji. W próbach zawierających nieozonowaną gumę obserwowano wyższe stężenie krytycznego stężenia tlenu. W ostatnich dniach procesu biodegradacji wartości badanego parametru dla gumy nie poddanej wstępnej obróbce ozonem były o około 30% wyższe niż w próbkach z ozonowanym materiałem. Uzyskane dane wskazują, że wstępne potraktowanie gumy ozonem powoduje zwiększenie podatności tego materiału na biodegradację i opóźnia pojawienie się "głodu tlenowego" w komórkach drożdży. Zakłada się, że wytwarzanie biosurfaktantów ma kluczowe znaczenie w tworzeniu biofilmów i może ułatwić bezpośredni kontakt mikroorganizmów z powierzchnią gumy tym, samym biodegradację tego trudnego odpadu [Yikmis and Steinbuechel, 2012]. Ustaliłam, że szczep *Candida methanosorbosa* BP-6 wykazuje wysoką aktywność emulgacyjną w zakresie  $\text{OD}_{500}$  1,330 do  $\text{OD}_{500}$  2,043. Najwyższe wartości aktywności emulgacyjnej, wskazujące na wysoką zawartość biosurfaktantów uzyskałam w obecności materiału gumowego poddanego wstępnej obróbce ozonem. Doniesienia o stosowaniu środków powierzchniowo czynnych w celu poprawy biodegradacji kauczuku są rzadkie [Tsuchii i Tokiwa, 2001; Eldho i współ., 2011]. Ocena stopnia rozkładu gumy z odpadowych opon przez szczep *C. methanosorbosa* BP-6 wykazała 40% ubytek masy próby dla gumy nie-ozonowanej i 60% ubytek masy próby dla gumy poddanej wstępnej obróbce ozonem. Wyniki analizy FTIR ujawniły zmiany w strukturze gumy (ozonowanej i nieozonowanej) po 21-dniowym procesie biodegradacji, które wskazują, że szczep *Candida methanosorbosa* BP-6 jest zdolny do degradacji odpadu. W próbach z ozonowaną gumą, po 21 dniowym procesie biodegradacji odnotowano spadek intensywności pików  $2845$  and  $2912 \text{ cm}^{-1}$ , związanych z drganiami rozciągającymi w grupach  $\text{CH}_2$  i  $\text{CH}_3$  oraz wzrost intensywności drgań w paśmie ketonowym przy około  $1710 \text{ cm}^{-1}$ ,

hydroksylowym przy  $3410\text{ cm}^{-1}$ , a także karbonylowym C – O przy  $1080\text{ cm}^{-1}$ . Również brak sygnałów pochodzących od wiązań zawartych w pierwszorzędowych aminach w widmie FTIR gumy po biodegradacji z udziałem drożdży *C. methanosorbosa* BP-6 sugeruje, że anilina została całkowicie usunięta z gumy, co uczyniło ją bardziej podatną na rozkład mikrobiologiczny.

Analiza zmian powierzchni materiału gumowego poddanego procesowi 21-dniowej biodegradacji przy użyciu *C. methanosorbosa* BP6 przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) potwierdziła zdolność komórek tych drożdży do penetracji i zmiany struktury gumy. Powierzchnia cząstek surowej gumy była gładka i jednorodna. Porównanie obrazów SEM gumy przed i po procesie ozonowania wykazało, iż proces wstępnego utleniania wpływa na zwiększenie chropowatości powierzchni badanego materiału. Poddanie odpadu gumowego działaniu szczepu *C. methanosorbosa* BP-6 wywołało zmiany w strukturze odpadu widoczne w postaci licznych wgłębień, pęknięć i zwiększonej chropowatości powierzchni gumy. Raporty na temat wykorzystania grzybów do degradacji gumy z opon są rzadkie i najczęściej odnoszą się do długotrwałej biodegradacji trwającej od 19 miesięcy do 5 lat [Yikmis and Steinbuchel, 2012]. Nie poruszają one możliwości degradacji aniliny obecnej w odpadzie gumowym, celem zwiększenia podatności materiału na biodegradację. Nie obejmują też roli biosurfaktantów w degradacji tego zanieczyszczenia. Wyniki uzyskane po zaledwie 21 dniach procesu biodegradacji sugerują, że wykorzystując szczep *C. methanosorbosa* BP-6 możliwe jest skrócenie czasu degradacji odpadów gumowych. Uzyskane wyniki sugerują, że możliwe jest opracowanie efektywnej biotechnologicznej metody rozkładu gumy.

**Wyniki mojej pracy są pierwszymi, w których wykorzystano drożdże do rozkładu gumy z odpadowych opon. Jako pierwsza problem biodegradowalności gumy rozpatrzyłam pod kątem możliwości usunięcia z niej antyoksydanta (aniliny) dzięki wykorzystaniu mikroorganizmu wykazującego wobec niego aktywność degradacyjną.**

**Za najważniejsze osiągnięcia opisanych badań zawartych w cyklu publikacji (H1-H8) uważam:**

- 1) poszerzenie wiedzy na temat możliwości stosowania technik wspomagających mikrobiologiczne procesy rozkładu zanieczyszczeń organicznych,
- 2) opracowanie dwóch skutecznych technik wspomagających rozkład zanieczyszczeń organicznych, możliwych do zastosowania zarówno w środowisku glebowym

- (bioremediacja enzymatyczna z wykorzystaniem wieloenzymowego preparatu grzybowego), jak i wodnym – ozonowany olej roślinny,
- 3) wykazanie, że stosowanie bioremediacji enzymatycznej jako narzędzia do zwiększania efektywności mikrobiologicznego rozkładu mieszanin węglowodorów wymaga stosowania wieloenzymowych preparatów, zawierające enzymy uczestniczące w biotransformacjach grup związków wchodzących w skład tego zanieczyszczenia,
  - 4) wykazanie, iż dobór techniki wspomagającej mikrobiologiczny rozkład zanieczyszczeń organicznych powinien być uzależniony nie tylko od składu zanieczyszczenia, ale również fazy biodegradacji, której efektywność wymaga zwiększenia,
  - 5) poszerzenie wiedzy na temat możliwości wykorzystania mikroorganizmów pozyskanych ze skażonego środowiska do degradacji zanieczyszczeń obecnych w miejscu izolacji,
  - 6) wykazanie, że antyoksydanty dodawane do paliwa typu biodiesel, takie jak TBHQ a także produkty mikrobiologicznego rozkładu biodiesla mogą negatywnie oddziaływać na środowisko (wolne kwasy tłuszczowe), wpływając tym samym na obniżenie aktywności metabolicznej mikroorganizmów,
  - 7) poszerzenie wiedzy na temat aktywności degradacyjnej mikroorganizmów endofitycznych pozyskanych z synantropijnej rośliny *Chellidonium majus* L. (Jaskółcze ziele),
  - 8) wykazanie, iż endofityczny szczep *Bacillus pumilus* 2A, pozyskany z jaskółczego ziela wykazuje wysoką aktywność degradacyjną wobec zanieczyszczeń petrochemicznych i może być zastosowany do usuwania tego typu skażeń ze środowiska,
  - 9) wskazanie na możliwość wykorzystania biosurfaktantów pozyskanych z mikroorganizmów endofitycznych jako czynników promujących wzrost roślin wzrastających w zanieczyszczonym środowisku,
  - 10) wykazanie, iż podatność gumy na biodegradację może zostać zwiększona poprzez usunięcie z niej antyoksydanta (aniliny), dzięki wykorzystaniu mikroorganizmu wykazującego wobec niego aktywność degradacyjną.

Reasumując, można stwierdzić, że opracowane techniki wspomagania mikrobiologicznej degradacji zanieczyszczeń wraz z pozyskaną wiedzą na temat aktywności degradacyjnej mikroorganizmów pozyskanych ze skażonego środowiska wobec składników zanieczyszczeń

obecnych w miejscu izolacji mogą przyczynić się do poprawy stanu środowiska naturalnego, sukcesywnie degradowanego wskutek działalności człowieka.

## 5. Literatura

1. Afzal M., Khan Q.M., Sessitsch A. *Endophytic bacteria: prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants*. Chemosphere, 2014; 117:232–242. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.06.078.
2. Alcade M., Ferrer M., Plou F.J., Ballesteros A. *Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes*, Trends in Biotechnology, 2006; 24: 281–287. doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.04.002.
3. Antczak T., Krystynowicz A., Galas E., *Wykorzystanie lipaz drobnoustrojowych do hydrolizy tłuszczów odpadowych*. III Sympozjum Naukowo-Techniczne „Biotechnologia Środowiskowa”, Ustroń-Jaszowiec, 1995; 32-40.
4. Bacon C.W., White J. *Microbial endophytes*. 2000. CRC press
5. Baoune H., Ould E.H., Pucci G., Sineli P., Loucif L., Polti M.A. *Petroleum degradation by endophytic Streptomyces spp. isolated from plants grown in contaminated soil of southern Algeria*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018; 147:602–609.
6. Bustamante M, Durán N, Díez MC. *Biosurfactants are useful tools for the bioremediation of contaminated soil: a review*. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 2012; 12:667–687. doi: 10.4067/S0718-95162012005000024
7. Chen T., Delgado B.S.G., Yavuz B.M., Proctor M.S.A.J., Maldonado B.S.J., Yi Z., Westerhoff P., Krajmalnik-Brown R., Rittmann B.E.. *Ozone enhances biodegradability of heavy hydrocarbons in soil*, Journal of Environmental Engineering and Science, 2016; 11(1):7-17. doi.org/10.1680/jenes.16.00002
8. Croom, E. *Metabolism of xenobiotics of human environments*. Progress in Molecular Biology and Translational Science, 2012; 112: 31-88. doi: 10.1016/B978-0-12-415813-9.00003-9. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.09.013.
9. Eldho A., Bibin M.C, Elbi P.A., Laly A.P., Sabu T., *Recent advances in the recycling of rubber waste*. Recent Development in Polymers Recycling, 2011; 1:47–100.
10. Fan P., Lu C. *Grafting of hyperbranched poly(amidoamine) onto waste tire rubber powder and its potential application as the curing agent for epoxy resin*. Polymers for Advances Technologies, 2012; 23: 48-56. doi: 10.1002/pat.1822

11. Goryluk A., Rekosz-Burlaga H., Błaszczuk M. *Isolation and characterization of bacterial endophytes of Chelidonium majus L.* Polish Journal of Microbiology, 2009;58(4):355-61.
12. Goyal P., Basniwal R.K. *Environmental Bioremediation: Biodegradation of Xenobiotic Compounds.* In: Hashmi M., Kumar V., Varma A. (eds) Xenobiotics in the Soil Environment. Soil Biology, 2017, vol 49. Springer, Cham
13. Guti\_erreiz-Larraínzar, M., Rúa, J., de Arriaga, D., del Valle, P., García-Armesto, M.R.. *In vitro assessment of synthetic phenolic antioxidants for inhibition of foodborne Staphylococcus aureus, Bacillus cereus and Pseudomonas fluorescens.* Food Control, 2013; 30:393-399. doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.07.047
14. Khan MSA, Singh B, Cameotra SS. *Biological applications of biosurfactants and strategies to potentiate commercial production biosurfactants.* Prod Util Processes Technol Econ. 2015;1:269–295. doi: 10.1201/b17599-16y.
15. Knapp J.S., Bromley-Challoner K.C.A. *Recalcitrant organic compounds* in Handbook of Water and Wastewater Microbiology, 2003. doi: 10.1016/B978-012470100-7/50035-2
16. Krosowiak K., Śmigielski K., Kwapisz E., Marchut O., *Remediacja gleby zanieczyszczonej węglowodorami naftowymi*, Zeszyty Naukowe. Technologia i Chemia Spożywcza / Politechnika Łódzka, 2008; nr 72 (nr 1029), 89--97.
17. Liu Q.Y., Liu Y.X., Lu X.J. *Combined photo-fenton and biological oxidation for the treatment of aniline wastewater.* Procedia in Environmental Science, 2012; 12:341–348. doi.org/10.1016/j.proenv.2012.01.287.
18. Lori A. Phillips, James J. Germida, Richard E. Farrell, Charles W. Greer, *Hydrocarbon degradation potential and activity of endophytic bacteria associated with prairie plants*, Soil Biology and Biochemistry, 2008; 40 (12): 3054-3064. doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.09.006.
19. Margesin, R., Zimmerbauer, A., Schinner, F. *Soil lipase activity – a useful indicator of oil biodegradation.* Biotechnology Techniques, 1999; 13:859. <https://doi.org/10.1023/A:1008928308695>
20. Mishra A., Singh S.P., Mahfooz S., Bhattacharya A., Mishra N., Shirke P.A., Nautiyal C.S. *Bacterial endophytes modulates the withanolide biosynthetic pathway and physiological performance in Withania somnifera under biotic stress.* Microbiological Research, 2018; 212–213:17–28. doi: 10.1016/j.micres.2018.04.006.
21. Mita L., Sica V., Guida M., Nicolucci C., Grimaldi T., Caputo L., Bianco M., Rossi S., Bencivenga U., Eldin M.S.M., Tufano M.A., Diano N. *Employment of immobilised lipase from Candida rugosa for the bioremediation of waters polluted by dimethylphthalate, as*



- a model of endocrine disruptors*. Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic, 2010; 62:133-141. doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.09.016.
22. Mucha K., Kwapisz E., Kucharska U., Okruszek A., *Mechanism of aniline degradation by yeast strain Candida methanosorbosa BP – 6*, Polish Journal of Microbiology, 2010; 59
23. Nair DN, Padmavathy S. *Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans*. Scientific World Journal, 2014; 2014:250693. doi:10.1155/2014/250693.
24. Pawlik M, Cania B, Thijs S, Vangronsveld J, Piotrowska-Seget Z. *Hydrocarbon degradation potential and plant growth-promoting activity of culturable endophytic bacteria of Lotus corniculatus and Oenothera biennis from a long-term polluted site*. Environmental Science and Pollution Research, 2017;24(24):19640–19652. doi:10.1007/s11356-017-9496-1.
25. Pawlik, M., Cania, B., Thijs, S. Vangronsveld J., Piotrowska-Seget Z. *Hydrocarbon degradation potential and plant growth-promoting activity of culturable endophytic bacteria of Lotus corniculatus and Oenothera biennis from a long-term polluted site*. Environmental Science and Pollution Research, 2017; 24: 19640. doi.org/10.1007/s11356-017-9496-1.
26. Phillips LA, Germida JJ, Farrell RE, Greer CW. *Hydrocarbon degradation potential and activity of endophytic bacteria associated with prairie plants*. Soil Biology and Biochemistry 2008;40(12):3054–3064. doi: 10.1016/j.soilbio.2008.09.006.
27. Piotrowska-Długosz A. (2017) *The Use of Enzymes in Bioremediation of Soil Xenobiotics*. In: Hashmi M., Kumar V., Varma A. (eds) Xenobiotics in the Soil Environment. Soil Biology, vol 49. Springer, Cham
28. Rieger P.G., Meier H-M., Gerle M., Vogt U., Groth T., Knackmuss H-J., *Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence*, J. of Biotechnol. 2002, 94, 101-123.
29. Ron EZ, Rosenberg E. *Natural roles in biosurfactants*. Environmental Microbiology, 2011; 3:229–236. doi: 10.1046/j.1462-2920.2001.00190.x
30. Soares, J., Pinto, A.M., Dejanira, F.A.. *Biodegradation of biodiesel/diesel blends by Candida viswanathi*. African Journal of Biotechnology, 2009; 8: 2774-2778.
31. Stępniewska Z, Kuźniar A. *Endophytic microorganisms--promising applications in bioremediation of greenhouse gases*. Applied Microbiology and Biotechnology 2013; 97(22):9589-96.
32. Sunar N.M., Emparan Quin, Karim Ahmad Tarmizi Abdul, Noor S.F.M., Maslan M., Mustafa F., Khaled N. *Bioremediation of Biofuel-Soil Contamination by Using Pseudomonas putida*", Advanced Materials Research, Vol. 845, pp. 138-145, 2014

33. Suthersan S.S., *Remediation engineering: design concepts*, Ed S.S. Suthersan CRC Press, Boca Raton, 1999
34. Szczęsna-Antczak M., Antczak T., Piotrowicz-Wasiak M., Rzyńska M., Binkowska N., Bielecki S. *Relationships between lipases and lipids in mycelia of two Mucor strains*, Enzyme and Microbial Technology, 2006; 39:1214-1222
35. Tsuchii A., Tokiwa Y., *Microbial degradation of Tire rubber particles*. Biotechnology Letters, 2001; 23:963–969.
36. Yikmis M., Steinbuchel A. *Historical and recent achievements in the field of microbial degradation of natural and synthetic rubber*. Applied and Environmental Microbiology, 2012; 78: 4543–4551. doi.org/10.1128/AEM.00001-12.
37. Yikmis M., Steinbuchel A., *Historical and recent achievements in the field of microbial degradation of natural and synthetic rubber*. Applied and Environmental Microbiology, 2012; 78: 4543–4551. doi.org/10.1128/AEM.00001-12.
38. Yu H, Zhang L, Li L, Zheng C, Guo L, Li W, Sunand P, Qin L. *Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes*. Microbiological Research, 2010; 165: 65(6):437-49. doi: 10.1016/j.micres.2009.11.009
39. Yuan D., L. Tian, z. Li, h. Jiang, C. Yan, j. Dong, H. Wu, B. Wang, *Solar thermocoupled electrochemical oxidation of aniline in wastewater for the complete mineralization beyond an anodic passivation film*, Scientific Reports, 2018; 8: 3103. doi.org/10.1038/s41598-018-21473-z.

## 6. Podsumowanie obszarów badawczych niewchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

Zagadnienia związane z biotechnologią środowiska obejmują nie tylko problemy związane ze skażeniem środowiska naturalnego czy utrudnioną biodegradacją związków syntetycznych, ale również zagospodarowanie odpadów i produkcję biopaliw.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk technicznych mój dorobek został oszacowany na **566 pkt**, z czego **214 pkt** przypada na osiągnięcie habilitacyjne.

Główne kierunki mojej dotychczasowej pracy naukowo-badawczej obejmują następujące zagadnienia:

1. Wykorzystanie parametrów biochemicznych do monitorowania procesów bioremediacji;
2. Analizy zjawiska sorpcji i desorpcji węglowodorów;
3. Mikrobiologiczna synteza węglowodorów;

4. Metody obróbki odpadów rolno-spożywczych przeznaczonych do procesów biotechnologicznych;

5. Biodegradacja polimerów.

Swoje doświadczenie w prowadzeniu badań nad bioremediacją gruntów zanieczyszczonych związkami ropopochodnymi wykorzystałam przy realizacji tematu związanego z „*Wykorzystaniem parametrów biochemicznych do monitorowania procesów bioremediacji*”, realizowanych w Instytucie Biochemii Technicznej, PŁ. Celem publikacji, będących wynikiem badań prowadzonych w ramach omawianego zagadnienia, było wykorzystanie parametrów biochemicznych do monitorowania procesów bioremediacji gleby zanieczyszczonej paliwami.

Realizacja celu badawczego obejmowała ocenę przebiegu procesu bioremediacji gleby zanieczyszczonej paliwami (biodiesel, olej napędowy, olej transformatorowy, olej popirolityczny) przy wykorzystaniu takich parametrów biochemicznych, jak: aktywność respirometryczna, aktywność dehydrogenaz, aktywność esteraz, poziom ATP, aktywność katalaz, czy fitotesty. Badania prowadzono w warunkach laboratoryjnych, prowadząc proces bioremediacji gleby zanieczyszczonej wybranymi paliwami (biodiesel, olej napędowy, olej transformatorowy, olej popirolityczny), z wykorzystaniem szczepów bakterii (*Bacillus mycoides* NS1020, *Pseudomonas sp.* A34, *Achromobacter xylosoxidans* G21, *Sarcina spp.*, *Gordonia alkanivorans* S7) wykazujących aktywności degradacyjne, dostępnych w zasobach Instytutu Biochemii Technicznej, PŁ. W trakcie prowadzenia procesu oczyszczania gleby co dwa tygodnie analizowano wybrane parametry biochemiczne. Wykazano, iż analiza aktywności respirometrycznej i aktywności dehydrogenaz glebowych pozwala na ocenę kondycji drobnoustrojów w trakcie procesów bioremediacji oraz, że aktywność dehydrogenaz oraz aktywność oddechowa mikroorganizmów pozostaje w ścisłej korelacji z ilością ATP w skażonym środowisku. Wykorzystując testy fitotoksyczności ustalono, że w przypadku oleju napędowego najwyższą toksyczność środowiska obserwuje się w początkowej i końcowej fazie procesu oczyszczania, przy czym wyższy stopień inhibicji kiełkowania nasion obserwowano dla gleby nieinokulowanej. W glebie zanieczyszczonej olejem popirolitycznym odnotowywano wysoką toksyczność środowiska w trakcie całego czasu trwania procesu oczyszczania, przy czym toksyczność ta znacząco zmalała w końcowej fazie bioremediacji. Różnice w przebiegu procesu oczyszczania są spowodowane odmiennym składem paliw oraz metabolitów powstających na skutek mikrobiologicznego rozkładu.

Wyniki przeprowadzonych badań zostały opublikowane w dwóch publikacjach z listy B MNiSW, w Czasopiśmie *Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*

1. Wieczorek D., Kwapisz E., **Marchut-Mikołajczyk O.**, Bielecki S., *Phytotests as tools for monitoring the bioremediation process of soil contaminated with diesel oil* **Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology**, 2012; 93(4): 431-439; <https://doi.org/10.5114/bta.2012.46597>

Punkty MNiSW = 13; IF = 0;

2. Wieczorek D., **Marchut-Mikołajczyk O.**, Antczak T., *Changes in the microbial dehydrogenase activity and the pH during bioremediation of fuel contaminated soil*, **Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology**, 2016; 96(4): 293-306; <https://doi.org/10.5114/bta.2015.58377>

Punkty MNiSW = 13; IF = 0;

Publikacja: Wieczorek D., Kwapisz E., Marchut-Mikołajczyk O., Bielecki S., *Phytotests as tools for monitoring the bioremediation process of soil contaminated with diesel oil* *Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*, 2012; 93(4): 431-439; <https://doi.org/10.5114/bta.2012.46597>, otrzymała Nagrodę Komitetu Biotechnologii PAN im. prof. Wacława Szybalskiego za najlepszą pracę naukową, opublikowaną w kwartalniku *BioTechnologia*. 2012

Pojawienie się w środowisku dużych ilości zanieczyszczeń ropopochodnych (najczęściej na skutek awarii podczas transportu) często wymaga zastosowania sorbentów, poprzedzających etap oczyszczania skażonego środowiska. W ramach zagadnienia „*Analizy zjawiska sorpcji i desorpcji węglowodorów*” nawiązałam współpracę naukowo-badawczą z firmą Supron. Zbadano możliwości sorpcyjne dostarczonych przez firmę Supron sorbentów naturalnych: SPILL SORB oraz nanosorbentu. Oceniono również możliwości ich zastosowania w procesach bioremediacji gleby zanieczyszczonej paliwami, zarówno tymi konwencjonalnymi (olej napędowy) jak i biopaliwami (czysty biodiesel i mieszaniny biodiesla z olejem napędowym). Wykazano, że oba sorbenty charakteryzuje wysoka zdolność sorpcji związków ropopochodnych z matrycy gruntu a ich zastosowanie pozwala w sposób znaczący (o ok. 50 %) skrócić czas prowadzenia procesu bioremediacji w przypadku dużych wycieków.

W ramach badań w zakresie omawianego zagadnienia nawiązałam również współpracę z panią dr hab. inż. Krystyną Wrześniewską-Tosik, Prof. IBWCh, z Instytutu Biopolimerów i

Włókien Chemicznych w Łodzi. W badaniach włókniste maty z aktywnym wypełnieniem w postaci piór wykorzystano jako sorbent znajdujący zastosowanie przy wyciekach produktów ropopochodnych. We współpracy z Instytutem Biopolimerów i Włókien Chemicznych w Łodzi podjęto próbę opracowania nowych, do tej pory nie znanych rodzajów materiałów kompozytowych w formie poduszek sorpcyjnych służących do zbierania oleistych substancji z powierzchni wód, wykorzystując do tego celu odpad w postaci piór. Pióra stanowią uciążliwy dla środowiska, niedegradowalny odpad, który, ze względu na jego właściwości można wykorzystać do ochrony środowiska, przed skutkami zanieczyszczenia ropą, w przypadku wycieku. Pomimo wysokich zdolności sorpcyjnych produktu problemem pozostaje jego utylizacja. Wykazano, iż przy wykorzystaniu szczepów *Gordonia alkanivorans* S7, *Pseudomonas sp.* A34, dostępnych w zasobach IBT, PŁ możliwe jest przeprowadzenie bioremediacji mat z zaadsorbowanymi związkami ropopochodnymi. Po 10 dniowym procesie oczyszczania uzyskano 40-50 % ubytek zanieczyszczenia, co sugeruje, iż metody biologiczne mogą być przydatne w procesach regeneracji mat z wypełnieniem z kurzych piór. Wyniki badań realizowanych we współpracy z Instytutem Biopolimerów i Włókien Chemicznych w Łodzi znalazły odzwierciedlenie w publikacji z listy JCR.

1. Wrześniewska-Tosik K, **Marchut-Mikołajczyk O**, Mik T, Wieczorek D, Pałczyńska M. *Mats for Removing Technical Oil Contamination*. **FIBRES & TEXTILES in Eastern Europe**, 2012; 20, 6B (96): 101-106;

Punkty MNiSW = **20**; IF(2012) = **0,801**; IF(5-letni) = **0,757**

Zmniejszające się zasoby paliw kopalnych na świecie i potrzeba pozyskiwania paliw odnawialnych stały się podstawą do przeprowadzenia badań obejmujących „**Mikrobiologiczną syntezę węglowodorów**”. Celem badań było przeprowadzenie skriningu szczepów bakterii i grzybów znajdujących się w zasobach Instytutu Biochemii Technicznej PŁ, pod kątem zdolności do syntezy węglowodorów. Wykazano, że spośród 50 badanych mikroorganizmów jedynie szczep bakterii *Gordonia alkanivorans* S7 oraz szczep pleśni *Mucor circinelloides* wykazują zdolność do produkcji węglowodorów i wydzielania ich do podłoża hodowlanego. Przeprowadzono badania mające na celu ekstrakcję węglowodorów z podłoża oraz określenie stężenia wydzielanych związków. Ujawniono, iż ilość zewnątrzkomórkowych węglowodorów produkowanych przez badane mikroorganizmy nie przekracza 0,05 % suchej masy. Uzyskane ilości mikrobiologicznych węglowodorów nie były wystarczające do prowadzenia dalszych badań w tym zakresie badawczym. W 2012 roku, w ramach omawianego zagadnienia otrzymałam stypendium naukowe Funduszu Młodych

Liderów Nauki na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej dla Młodych Liderów Nauki na projekt „Mikrobiologiczna synteza węglowodorów-od ropy naftowej do czystych związków”.

Badania związane z pozyskiwaniem paliw odnawialnych realizowałam również w ramach tematu „*Metody obróbki odpadów rolno-spożywczych przeznaczonych do procesów biotechnologicznych*” realizowanego we współpracy z Instytutem Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej. Celem badań opisanych w publikacjach był dobór metod obróbki wstępnej odpadu rolniczego w postaci słomy żytniej służącej zwiększeniu jego podatności na rozkład mikrobiologiczny. Realizacja celu badawczego obejmowała:

- dobór warunków chemicznej obróbki wstępnej słomy żytniej przy użyciu amoniaku w celu konwersji surowca do fermentowalnych cukrów, stanowiących potencjalny surowiec do procesów biotechnologicznych.

-optymalizację procesu ozonowania słomy żytniej, jako metody obróbki surowca poddanego następnie fermentacji beztlenowej.

Powyższe cele były weryfikowane w doświadczeniach modelowych prowadzonych w warunkach laboratoryjnych. Wykazano, iż obróbka wstępna z użyciem 2% roztworu amoniaku, prowadzona w temperaturze 60°C i 90°C pozwala na uzyskanie ze słomy żytniej większej ilości cukrów redukujących niż ma to miejsce w przypadku hydrolizy surowca prowadzonej w wodzie, w tych samych warunkach temperaturowych. Wyniki eksperymentalne wykazały, że stężenie cukrów redukujących i lotnych kwasów tłuszczowych (VFA) w słomie żytniej po 8-godzinnej hydrolizie za pomocą amoniaku było odpowiednio około 1,3 i 5,2 razy większe w temperaturze 60 °C i 1,8 i 5,2 razy wyższe w temperaturze 90 °C, w porównaniu do próbek, w których prowadzono wodną hydrolizę słomy żytniej. Uzyskana po 8 godzinnej hydrolizie słomy żytniej 2% wodnym roztworem amoniaku wydajność glukozy (51%) wskazuje, że metoda ta może być wykorzystywana w procesach biotechnologicznych jako metoda obróbki wstępnej surowca.

Z kolei w badaniach mających na celu optymalizację procesu ozonowania słomy żytniej, jako metody obróbki słomy żytniej do zaplanowania eksperymentów wykorzystano metodę Taguchi. Wykazano, iż ozonowanie stanowi efektywną metodę obróbki wstępnej słomy żytniej przed poddaniem surowca procesowi fermentacji beztlenowej. Wykazano, iż w optymalnych warunkach procesu tj. dla 15 g słomy żytniej poddanej działaniu ozonu w dawce 100 gO<sub>3</sub> / m<sup>3</sup>, w czasie 60 min możliwe jest uzyskanie metanu w ilości 291,71 dm<sup>3</sup> CH<sub>4</sub> / kg VS.

Wyniki powyższych badań zostały przedstawione w dwóch publikacjach z listy JCR:

1. Domanski J., Borowski S., **Marchut-Mikołajczyk O.**, Kubacki P., *Pretreatment of rye straw with aqueous ammonia for conversion to fermentable sugars as a potential substrates in biotechnological processes*, **Biomass and Bioenergy**, 2016; 91: 91-97; <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.05.008>

Punkty MNiSW = **35**; IF(2016) = **3,219**; IF(5-letni) = **4,232**

2. Domański J., **Marchut-Mikołajczyk O.**, Polewczyk A., Januszewicz B., *Ozonolysis of straw from *Secale cereale L.* for anaerobic digestion*, **Bioresource Technology**, 2017; 245, Part A: 394-400; <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.090>;

Punkty MNiSW = **45**; IF(2017) = **5,807**; IF(5-letni) = **5,978**

W roku 2018 podjęłam współpracę naukowo-badawczą z panią dr hab. Anitą Białkowską z Zakładu Produktów Naftowych, Wydziału Materiałoznawstwa, Technologii i Wzornictwa, Uniwersytetu Technologiczno-Humanistycznego im. Kazimierza Pułaskiego w Radomiu. Wykorzystując swoje doświadczenie związane z biodegradacją związków organicznych podjęłam się oceny podatności na biodegradację opracowanych przez dr. Białkowską bezizocyjanianowych segmentowych poliuretanów kondensacyjnych. W ramach tematu związanego z „*Biodegradacją polimerów*” przeprowadziłam biodegradację polimerów otrzymanych przez dr hab. A. Białkowską, za pomocą aerobowego szczepu bakterii *Achromobacter xylosoxidans* G21, wybranego na podstawie wyników skriningu przeprowadzonego spośród 30 szczepów wykazujących aktywność degradacyjną, znajdujących się w zasobach IBT, PŁ. Biodegradacji poddano poliuretany otrzymane z liniowych oraz rozgałęzionych oligoeteroli, mocznika, kwasu fenolosulfonowego, kwasu 2 – hydroksynaftaleno – 6 – sulfonowego i różnych ilości formaldehydu. Wykazano, iż regularność struktury oraz zwiększenie stopnia usieciowania polimeru wpływają na zwiększenie odporności na działanie bakterii. Na podstawie analizy elementarnej, DSC, FTIR oraz SEM stwierdzono odporność łańcucha oligooksybutylenowego polioksybutylenouretanów na bakterie *Achromobacter xylosoxidans* G21, częściową degradację łańcucha oligooksypropylenowego polioksypropylenouretanu i biodegradację ugrupowań mocznikowych, uretanowych i grup sulfonowych wchodzących w skład obszarów krystalicznych w badanych PU. Wyniki badań realizowanych we współpracy Wydziału Materiałoznawstwa, Technologii i Wzornictwa, Uniwersytetu Technologiczno-Humanistycznego im. Kazimierza Pułaskiego w Radomiu. znalazły odzwierciedlenie w publikacji z listy JCR.

1. Białkowska A., Bakar M., **Marchut-Mikołajczyk O.**, *Biodegradation of linear and branched nonisocyanate condensation polyurethanes based on 2-hydroxy-naphthalene-6-sulfonic acid and phenol sulfonic acid*, **Polymer Degradation and Stability**, 2019; 159: 98-106; <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2018.11.011>;

Punkty MNiSW = **35**; IF(2019) = **3,193**; IF(5-letni) = **3,797**

Obecnie, oprócz badań związanych z opracowaniem technologii bioremediacji gruntu zanieczyszczonego olejem krezotowym, realizowanych w ramach projektu rozwojowego (POIR 04.01.02-00-0057.17), zajmuję się poszukiwaniem substancji biologicznie aktywnych, z mikroorganizmów endofitycznych izolowanych z synantropijnych roślin leczniczych, takich jak Pokrzywa zwyczajna (*Urtica dioica* L.), Rumianek pospolity (*Matricaria chamomilla*), Babka lancetowata (*Plantago lanceolata* L.). Pozyskanie takich substancji jak biosurfaktanty (glikolipidy lub lipopeptydy) stwarza możliwości zastosowania tych substancji zarówno w biotechnologii środowiska jak również w przemyśle kosmetycznym czy farmaceutycznym. Tego rodzaju badania wykonuje pod moją opieką Pan mgr inż. Piotr Drożdżyński. Do tej pory udało się wyizolować 25 mikroorganizmów endofitycznych, z których 15 wykazuje zdolność do wydajnej produkcji związków powierzchniowo czynnych. Obecnie trwają badania nad identyfikacją budowy pozyskanych biosurfaktantów oraz identyfikacją przynależności gatunkowej endofitów pozyskanych z badanych roślin. W planach jest zastosowanie otrzymanych biosurfaktantów do wspomagania rozkładu różnych rodzajów zanieczyszczeń (olej krezotowy, guma, żywice) oraz optymalizacja produkcji pozyskanych związków.

## 7. Podsumowanie

Mój dorobek naukowy, po uzyskaniu stopnia doktora nauk technicznych obejmuje łącznie 17 prac (14 w języku angielskim i 3 w języku polskim) i 9 patentów, w tym 15 prac i wszystkie 9 patentów po uzyskaniu stopnia doktora. Mój dorobek obejmuje prace doświadczalne w formie 14 artykułów recenzowanych w czasopiśmie krajowych i zagranicznych, 2 rozdziały w monografii, 1 pracę przeglądową, 12 referatów i doniesień na konferencjach krajowych i międzynarodowych oraz 2 referatów na konferencjach popularyzujących naukę.

Prace prezentowane w wyżej wymienionych publikacjach realizowałam zarówno w Instytucie Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej jak i we współpracy Instytutem



Podstaw Chemii Żywności i Instytutem Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, PŁ; Zakładem Chemii Organicznej na Wydziale Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej, Instytutem Technologii Drewna w Poznaniu, Instytutem Biopolimerów i Włókien Chemicznych w Łodzi oraz Zakładem Produktów Naftowych, Wydziału Materiałoznawstwa, Technologii i Wzornictwa, Uniwersytetu Technologiczno-Humanistycznego im. Kazimierza Pułaskiego w Radomiu. Od roku 2014 realizuję również współpracę naukowo-badawczą z Instytutem Technologii Bezpieczeństwa „Moratex”, w Łodzi oraz Katedrą Materiałoznawstwa Towaroznawstwa i Metrologii Włókienniczej, Politechniki Łódzkiej.

W ramach współpracy naukowo-badawczej z przemysłem współpracuję w firmami: Zakłady Chemiczne Warter, Miranda Textiles, Bioagra Oil S.A., Supron Sp z o.o., Orzeł S.A., Nasycalnia Podkładów Sp z o.o. w Koźminie Wielkopolskim.

W latach 2010-2018 (z roczną przerwą w latach 2011-2012, związaną z urodzeniem dziecka), prowadziłam również działalność dydaktyczną oraz organizacyjną.

#### Działalność organizacyjna i prace eksperckie

Od roku 2017 do chwili obecnej pełnię funkcję Zastępcy Przewodniczącego Komisji Rekrutacyjnej, na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej. Jestem również członkiem Komisji Rekrutacyjnej, na Wydziale International Faculty of Engineering, Politechniki Łódzkiej, na kierunku Biotechnology. W ramach prac Komisji uczestniczę w rozmowach kwalifikacyjnych przeprowadzanych w ramach rekrutacji na drugi stopień studiów na kierunku Biotechnology, odbywających się w języku angielskim.

W roku 2013 byłam członkiem komisji ds. utworzenia nowego kierunku Biotechnologia Środowiska na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechniki Łódzkiej. Następnie w latach 2014-2018 byłam członkiem Komisji ds. kształcenia na kierunku Biotechnologia Środowiska, na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej.

W roku 2015 uczestniczyłam w organizacji egzaminów wstępnych na Politechnikę Łódzką i prowadziłam nadzór nad sprawdzianem uzdolnień plastycznych na Wydziale Technologii Materiałowych i Wzornictwa Tekstyliów, Politechniki Łódzkiej.

W trakcie pracy w Instytucie Biochemii Technicznej, Politechniki Łódzkiej podjęłam się realizacji ekspertyz i prac badawczych i analitycznych zleconych przez przedstawicieli sektora gospodarczego, takich jak: EC Industria Krzysztof Holwek, Environmental Solutions Poland sp. z o.o.

W roku 2015 i 2016 uczestniczyłam w przygotowaniu dwóch wniosków projektowych do Narodowego Centrum Badań i Rozwoju, przygotowywanych w ramach konsorcjum naukowo-przemysłowego, w skład którego wchodziły: Politechnika Łódzka (Instytut Biochemii Technicznej i Katedra Materiałoznawstwa Towaroznawstwa i Metrologii Włókienniczej), Instytut Technologii Bezpieczeństwa „Moratex”, z Łodzi oraz przedsiębiorstwo Miranda Textiles, z Turku. Jako przedstawiciel Instytutu Biochemii Technicznej, PŁ czynnie uczestniczyłam w spotkaniach konsorcjum, byłam odpowiedzialna za przygotowanie merytorycznej części wniosku projektowego oraz budżetu projektu w odniesieniu do zadań realizowanych przez IBT, PŁ. Żaden z wniosków projektowych nie otrzymał finansowania. Jednakże efektem współpracy naukowo-badawczej prowadzonej w ramach stworzonego konsorcjum jest zgłoszenie patentowe (P.422380).

Od 2014 roku wykonałam 15 recenzji oryginalnych artykułów naukowych w następujących czasopismach: *International Biodeterioration and Biodegradation*, Elsevier, IF=3.562; *Environmental Science and Pollution Research*, Springer, IF=2.8; *Process Biochemistry*, Elsevier, IF=2.616; *Applied Microbiology and Biotechnology*, Springer; IF=3.340; *Open Journal of Environmental Biology*, Peertechz, 2018; *Brazilian Journal of Microbiology*, Elsevier; *Environment Protection Engineering*, Wrocław University of Science and Technology; IF 0.486.

Od roku 2016 do chwili obecnej pełnię funkcję edytora w czasopiśmie *Archives of Petroleum and Environmental Biotechnology* (ISSN 2574-7614); Gavin Publishers, IF= 0,52.

Od roku 2016 do chwili obecnej jestem członkiem Rady Instytutu Biochemii Technicznej, Politechniki Łódzkiej, jako przedstawiciel Adiunktów.

W roku 2017 byłam członkiem komitetu organizacyjnego Konferencji „Biotechnologia dla Biogospodarki „z okazji 50-lecia IBT, PŁ, która odbyła się w Sandomierzu, w dniach 19-21 maja 2017.

#### Działalność dydaktyczna i popularyzatorska

W ramach działalności dydaktycznej do chwili obecnej prowadzę zajęcia dla studentów Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności oraz Centrum Kształcenia Międzynarodowego Politechniki Łódzkiej. Zajęcia te obejmują zarówno wykłady jak i zajęcia laboratoryjne i fakultatywne dla studentów zarówno pierwszego jak i drugiego stopnia studiów. Szczegółowy opis realizowanych zadań dydaktycznych zamieściłam w Załączniku 4.

W ramach działalności dydaktycznej opracowałam, prowadziłam i prowadzę następujące zajęcia dla studentów Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej: **Technologie remediacji** (wykład i laboratorium) dla kierunku Ochrona Środowiska (2010-2015) Biotechnologia Środowiska (2013-2018); **Procesy biodegradacji** (wykład) dla kierunku Ochrona Środowiska (2010-2015) Biotechnologia Środowiska (2013-2018); **Biochemiczne aspekty ochrony środowiska** (seminarium) dla kierunku Ochrona Środowiska (2010-2015) Biotechnologia Środowiska (2013-2018); **Biotechnologia produkcji energii** (wykład) dla kierunku Biotechnologia Środowiska; **Biotechnologia ogólna** (wykład i laboratorium) dla kierunku Biotechnologia; **Innowacje w biotechnologii** (wykład) dla kierunku Biotechnologia; **Biotechnologia specjalizacyjna** (wykład specjalizacyjny) dla kierunku Biotechnologia; **Biochemiczne podstawy biodegradacji** (wykład fakultatywny) dla kierunku Biotechnologia; **Biotechnologia przemysłowa** (wykład) dla kierunku Biogospodarka; **Problem Base Learning** dla kierunku Biogospodarka; dla studentów Centrum Kształcenia Międzynarodowego: **Principles in biotechnology** (laboratorium) dla kierunku Biotechnology.

W chwili obecnej jestem kierownikiem 7 przedmiotów: **Technologie remediacji, Procesy biodegradacji, Biotechnologia w produkcji energii, Innowacje w biotechnologii, Biotechnologia specjalizacyjna, Biochemiczne podstawy biodegradacji, Biotechnologia przemysłowa.**

W latach 2012-2015 pełniłam funkcję opiekuna roku studiów stacjonarnych pierwszego stopnia na kierunku Ochrona Środowiska.

W latach 2011-2019 byłam opiekunem **36** prac dyplomowych na studiach pierwszego stopnia (na kierunku Ochrona Środowiska, Biotechnologia środowiska, Biotechnologia i Biotechnology) oraz **24** prac magisterskich na kierunku Ochrona Środowiska, Biotechnologia oraz Biotechnology).

W latach 2013-2017 pełniłam funkcję promotora pomocniczego w przewodach doktorskich pani mgr inż. Doroty Wieczorek i pana mgr inż. Arkadiusza Polewczyka. Oba przewody doktorskie zostały zakończone: Dorota Wieczorek, stopień naukowy doktora – 22.03.2016; Arkadiusz Polewczyk, stopień naukowego doktora – 31.01.2017 r.

Od maja 2014 roku pełnię funkcję promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim pani mgr inż. Agnieszki Pawlak.

W roku 2012, mgr inż. Bartosz Strzelecki, otrzymał nagrodę w konkursie na Najlepszą Pracę Magisterską zorganizowanym przez Wojewódzki Fundusz Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej w Łodzi. Praca magisterska mgr inż. Bartosza Strzeleckiego, pt. „Mikrobiologiczny rozkład biodiesla w gruncie”, była realizowana pod moją opieką.

W roku 2017, dr inż. Arkadiusz Polewczyk, w którego przewodzie doktorskim pełniłam rolę promotora pomocniczego, otrzymał nagrodę za Najlepszą Pracę Doktorską w konkursie zorganizowanym przez Wojewódzki Fundusz Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej w Łodzi.

W celu podwyższenia moich kwalifikacji zawodowych w 2014 roku ukończyłam **Studia Podyplomowe „Menedżer projektu badawczo-rozwojowego”** na Wydziale Administracji Wyższej Szkoły Bankowej w Chorzowie, oddział w Łodzi. Ponadto w grudniu 2017 roku uczestniczyłam w szkoleniu warsztatowym dla nauczycieli akademickich metodą **Design Thinking**, realizowanym w ramach Budżetu Zadaniowego Politechniki Łódzkiej na rok 2017.

Na moją działalność popularyzatorską składa się czynny udział w Festiwalu Nauki Techniki i Sztuki oraz udział w organizowanej przez Koło Naukowe „Ferment” przy Wydziale Biotechnologii i Nauk o żywności, PL konferencji Konferencji „Po ciemnej stronie nauki, czyli zagrożenia chemiczne, biologiczne, radiologiczne i jądrowe” w 2016 roku.

Moja dotychczasowa dydaktyczna i naukowa zostały wyróżnione nagrodami **Rektora PŁ**. W latach 2013-2017 otrzymałam nagrody **za działalność dydaktyczną**, a w latach 2016 i 2018 **za działalność naukową**. Ponadto, w 2012 roku otrzymałam Nagrodę Komitetu Biotechnologii PAN im. Prof. Wacława Szybalskiego za najlepszą pracę naukową, opublikowaną w kwartalniku BioTechnologia

## 8. Sumaryczne zestawienie dorobku naukowego

Osiągnięcie będące podstawą do ubiegania się o uzyskanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk technicznych zostało przedstawione w publikacjach oraz patentach o łącznej wartości współczynnika impact factor:

IF=**15,656**; IF 5-letni=**18,070**; punkty MNiSW=**214**

Pozostałe osiągnięcia naukowe zostały opisane w publikacjach i patentach o łącznej wartości współczynnika impact factor:

IF=**13,019**; IF 5-letni=**17,464**; punkty MNiSW=**362**

Sumaryczny IF= **28,675**; IF 5-letni=**32,834**; punkty MNiSW= **566**

Index Hirsha:

-według Web of Knowledge All Databases wynosi **3**, suma cytowań to **53**

-według bazy Scopus wynosi **4**, suma cytowań to **60**

Tabela 1. Sumaryczne zestawienie kryteriów osiągnięć wnioskodawcy

Rodzaj publikacji	Przed doktoratem	Po doktoracie	Razem
<b>Publikacje w czasopismach <i>Journal Citation Report (JCR)</i> – kat. A, w tym:</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
- publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe	0	4	4
- pozostałe publikacje	1	4	5
<b>Pozostałe oryginalne publikacje twórcze, w tym:</b>	<b>1</b>	<b>14</b>	<b>15</b>

- oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach spoza listy JCR – kat. B	1	5	6
- publikacje recenzowane spoza listy MNiSW	0	7	7
- rozdziały w monografiach w j. polskim	0	2	2
<b>Sumaryczny 5-letni Impact Factor</b>	<b>3,631</b>	<b>32,834</b>	<b>36,465</b>
- publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe	0	18,07	18,07
- pozostałe publikacje	3,631	14,764	18,395
<b>Punkty MNiSW za publikacje, zgodnie z rokiem wydania</b>	<b>32</b>	<b>341</b>	<b>373</b>
- publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe	0	167	167
- pozostałe publikacje	32	174	206
Projekty badawcze finansowane ze źródeł zewnętrznych	0	1	1
Projekty/zadania badawcze finansowane z działalności statutowej	0	9	0/9
<b>Udział w konferencjach</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>12</b>
Komunikaty na konferencjach międzynarodowych	2	5	7
Komunikaty na konferencjach krajowych	2	3	5
<b>Patenty</b>	<b>0</b>	<b>9</b>	<b>9</b>
Patenty stanowiące osiągnięcie naukowe	0	2	2
Pozostałe patenty	0	7	7
<b>Punkty MNiSW za patenty</b>	<b>0</b>	<b>270</b>	<b>270</b>
- patenty stanowiące osiągnięcie naukowe	0	60	60
- pozostałe patenty	0	210	210
<b>Recenzje publikacji</b>	<b>0</b>	<b>15</b>	<b>15</b>

- oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach spoza listy JCR – kat. B	1	5	6
- publikacje recenzowane spoza listy MNiSW	0	7	7
- rozdziały w monografiach w j. polskim	0	2	2
<b>Sumaryczny 5-letni Impact Factor</b>	<b>3,631</b>	<b>32,834</b>	<b>36,465</b>
- publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe	0	18,07	18,07
- pozostałe publikacje	3,631	14,764	18,395
<b>Punkty MNiSW za publikacje, zgodnie z rokiem wydania</b>	<b>32</b>	<b>341</b>	<b>373</b>
- publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe	0	167	167
- pozostałe publikacje	32	174	206
Projekty badawcze finansowane ze źródeł zewnętrznych	0	1	1
Projekty/zadania badawcze finansowane z działalności statutowej	0	9	0/9
<b>Udział w konferencjach</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>12</b>
Komunikaty na konferencjach międzynarodowych	2	5	7
Komunikaty na konferencjach krajowych	2	3	5
<b>Patenty</b>	<b>0</b>	<b>9</b>	<b>9</b>
Patenty stanowiące osiągnięcie naukowe	0	2	2
Pozostałe patenty	0	7	7
<b>Punkty MNiSW za patenty</b>	<b>0</b>	<b>270</b>	<b>270</b>
- patenty stanowiące osiągnięcie naukowe	0	60	60
- pozostałe patenty	0	210	210
<b>Recenzje publikacji</b>	<b>0</b>	<b>15</b>	<b>15</b>

*Olga Marchut-Mikołajczyk*