

Łódź, 27.05.2019 r.



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA**
Uniwersytet Łódzki

Dr. hab. Przemysław Bernat, prof. UŁ
Uniwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Kowalskiej
pt. " WPŁYW DODATKU MINERALNYCH MIKROCZĄSTEK
NA ROZWÓJ FORM MORFOLOGICZNYCH
GRZYBÓW STRZĘPKOWYCH W HODOWLACH WGŁĘBNYCH"

Pracę doktorską wykonano w Katedrze Inżynierii Bioprocessowej na Wydziale Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska Politechniki Łódzkiej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Marcina Bizukojcia

1. Charakterystyka pracy

Prezentowana do recenzji rozprawa doktorska jest pracą eksperymentalną. Rozpoczyna ją streszczenie i dwudziestostronicowy wstęp. Autorka na początku charakteryzuje mikroorganizmy strzępkowe, promieniowce i grzyby strzępkowe. Następnie omawia taksonomię czterech wybranych gatunków grzybów strzępkowych. Doktorantka dalej w przystępny sposób opisuje etapy cyklu życia grzybów strzępkowych mające bezpośredni wpływ na przebieg wgłębnych hodowli przemysłowych oraz podaje formy morfologiczne grzybów strzępkowych w hodowlach wgłębnych i czynniki wpływające na ich kształtowanie.

Wprowadzone zostaje pojęcie mineralnych mikrocząstek. W kolejnym etapie Autorka przedstawia mechanizmy tworzenia aglomeratów grzybów strzępkowych w hodowlach wgłębnych. W wyczerpujący sposób Doktorantka opisuje tradycyjne metody sterowania morfologią grzybów strzępkowych aby następnie zwrócić uwagę na rozwój nowoczesnych metod, określanych mianem inżynierii morfologii, obejmujących także zagadnienie mineralnych mikrocząstek. Kończąc ta część pracy Doktorantka uzasadnia konieczność poszerzania wiedzy na temat hodowli typu MPEC (hodowla z dodatkiem mineralnych mikrocząstek) grzybów strzępkowych należących do różnych rodzajów i wykazujących różne mechanizmy tworzenia morfologii.

Kolejna część rozprawy została poświęcona prezentacji celów i tezy pracy. Doktorantka stawia hipotezę, że wpływ mikrocząstek na wzrost grzybów strzępkowych może być uzależniony od mechanizmu rozwoju danego mikroorganizmu oraz wielkości obiektów, z którymi oddziałują. W związku z tym celem pracy zaprezentowanym przez Autorkę jest *Opracowanie ilościowego opisu wzrostu grzybów strzępkowych o różnych mechanizmach tworzenia form morfologicznych we wgłębnych hodowlach standardowych oraz w hodowlach typu MPEC, na podstawie eksperymentów z udziałem *Aspergillus terreus*, *Penicillium rubens*, *Chaetomium globosum* i *Mucor racemosus* hodowanych w kolbach wstrząsanych i bioreaktorze zbiornikowym mieszadłowym.* Do wykonania tak przedstawionego celu pracy Doktorantka zaprezentowała niezbędny zakres planowanych badań uzupełniony o jego graficzne wytłumaczenie (rys 5) .

W kolejnej części pracy zamieszczono rozdział poświęcony materiałom i metodom. Autorka opisała w nim pochodzenie pięciu szczepów grzybowych używanych w pracy, skład podłoży sporulacyjnych i hodowlanych. Zostały także omówione warunki hodowli w kolbach i bioreaktorze. Szczególną uwagę poświęcono cyfrowej obróbce i analizie obrazów mikroskopowych. Doktorantka dokładnie opisała schemat przygotowania materiału do zdjęć i samą obróbkę zdjęć obrazów mikroskopowych z zastosowaniem techniki cyfrowej analizy obrazów. Autorka w przystępny sposób objaśniła sposób w jaki określano cztery morfologiczne parametry wielkości i kształtu obserwowanych elementów grzybni, tzn. średnie pole powierzchni rzutu, wydłużenie, szorstkość i liczba morfologii. Doktorantka podała także w jaki sposób otrzymane wyniki poddawano analizie statystycznej. Kolejnym

elementem tego rozdziału był opis sposobu analizy składników podłoży hodowlanych oraz zastosowane metody obliczeniowe dla modeli kinetycznych wzrostu badanych mikroorganizmów.

Najbardziej obszerna część pracy doktorskiej jest poświęcona wynikom badań. Początkowa część tego rozdziału dotyczyła zaprezentowaniu rezultatów dotyczących wczesnych stadiów wzrostu czterech różnych gatunków grzybów strzępkowych w standardowych dobowych hodowlach wgłębnych w kolbach wstrząsanych. Następnie Autorka omówiła wyniki dla wzrostu tych samych drobnoustrojów w obecności mikrocząstek tlenku glinu. W kolejnej części zaprezentowane zostały rezultaty badań dotyczące hodowli grzybów strzępkowych w bioreaktorach bez i z dodatkiem mikrocząstek w okresie do 170 godzin. Doktorantka posiłkując się licznymi zdjęciami ilustrującymi wzrost grzybni oraz wykresami przedstawianymi przebieg zmian w średnim polu powierzchni rzutu A, podziale obiektów mycelialnych na klasy, liczby morfologii Mo, wydłużenia E i szorstkości R omawiała poszczególne modyfikacje w morfologii drobnoustrojów w czasie. Uzupełnieniem tych wyników były dane dla poziomu azotu ogólnego i cukrów (w zależności od drobnoustroju glukozy i/lub laktozy) w podłożu hodowlanym oraz zmiany parametrów procesowych: stopnia nasycenia tlenem, potencjału redoks i pH. Należy podkreślić, że rozdział zawiera liczne wykresy i zdjęcia ułatwiające zaznajomienie z uzyskanymi wynikami. Dane doświadczalne, uzyskane za pomocą analizy obrazu zdjęć mikroskopowych wykonanych obiektom pochodzącym z hodowli w kolbach wstrząsanych oraz hodowli w bioreaktorach, posłużyły Autorce do wyznaczenia stałych oraz weryfikacji modelu kinetycznego.

Pracę doktorską kończy zwięzła dyskusja wyników otrzymanych w trakcie kolejnych eksperymentów z danymi literaturowymi. Następnie umieszczone są cztery wnioski, w których zawarto stwierdzenia podsumowujące sposób w jaki mikrocząstki wpływają na morfologię i parametry kinetyczne wzrostu. Na zakończenie Autorka umieściła spis pozycji literaturowych, użytych w trakcie przygotowywania pracy.

2. Zasadność podjętej tematyki

Mikroorganizmy strzępkowe znajdują szerokie zastosowanie w komercyjnej produkcji wielu różnorodnych związków. Jednym z najistotniejszych parametrów hodowli wywierającym

wpływ na wydajność produkcji jest morfologia drobnoustrojów. Choć do tej pory stosowano różne metody standaryzacji morfologii grzybów w trakcie hodowli do celów przemysłowych, nadal istnieje potrzeba udoskonalania jej kontroli. W ostatnich latach, nowatorskie podejście do tego tematu nastąpiło poprzez zastosowanie mikrocząstek dodawanych do hodowli grzybów strzępkowych. Metody oparte o mikrocząstki uważa się za tanie, łatwe do wdrożenia i nie oddziałujące negatywnie na metabolizm drobnoustrojów oraz powstające produkty. Obserwowany wzrost liczby publikacji opisujących zastosowanie hodowli mikroorganizmów z dodatkiem mikrocząstek świadczy o zauważeniu potencjału tej metody. Jakkolwiek w dalszym ciągu dysponujemy zbyt małą ilością danych aby móc w pełni zrozumieć jej zasadę. Niezbędne jest więc wdrożenie zaawansowanych technik analizy obrazu i modelowania matematycznego w celu obserwacji oddziaływań mineralnych mikrocząstek na morfologię kolejnych gatunków drobnoustrojów. Dlatego uważam, że podjęta przez Doktorantkę tematyka pracy jest jak najbardziej zasadna i aktualna.

3. Walory pracy

Praca przedstawia bardzo wartościowe i ważne z poznawczego i aplikacyjnego punktu widzenia badania poświęcone opracowaniu ilościowego opisu wzrostu grzybów strzępkowych o różnej morfologii hodowanych z dodatkiem mineralnych mikrocząstek. Zaprezentowane wyniki wnoszą nowe informacje na temat hodowli typu MPEC grzybów nieaglomerujących należących do klasy *Zygomycetes* oraz aglomerujących z klasy *Ascomycetes*. Do najważniejszych zaliczam poniższe osiągnięcia pracy.

Wykazano, że mikrocząstki ułatwiają aglomerację małych obiektów mycelialnych a utrudniają łączenie się dużym obiektom. Z tego wynika rozpraszanie morfologii grzybów aglomerujących oraz wywoływanie aglomeracji u grzybów nieaglomerujących.

Opisanie procesu tworzenia peletek bez i w obecności mikrocząstek tlenku glinu dla grzyba *Ch. globosum*, pomimo braku doniesień literaturowych na temat tego gatunku grzyba strzępkowego.

Większość doniesień literaturowych dotyczy badań nad grzybami z rodzaju *Aspergillus*, więc wykazanie, że dodatek mikrocząstek do hodowli *M. racemosus* wymusza

aglomerację strzępek, a w rezultacie powstanie nieregularnych peletek jest istotnym nowym elementem badań.

Za ważny element pracy uważam zaproponowanie modelu kinetycznego, który zastosowano do opisu przebiegu wczesnych stadiów wzrostu grzybów strzępkowych o różnych mechanizmach wzrostu, co świadczy o jego uniwersalności

Zamieszczony w pracy opis uzyskanych badań jest klarowny, Autorka umiejętnie dyskutuje swoje wyniki doświadczeń w oparciu o dane literaturowe. Sposób omówienia uzyskanych danych świadczy o dobrym merytorycznym przygotowaniu Doktorantki do rozwiązywania poruszanych w pracy problemów.

4. Uwagi

Praca została napisana poprawnie, drobne błędy edytorskie w tekście nie wpływają na odbiór pracy.

- Proszę stosować nazwy skrócone drobnoustrojów (dotyczy to zwłaszcza wstępu)
- Proszę o podanie objętości roboczej bioreaktora
- Dlaczego w pracy stosowano akurat te mikrocząstki, tlenek glinu a nie np. talk? I dlaczego w takim stężeniu
- Hodowle w bioreaktorze poddano analizom stężenia źródła węgla (laktozy i/lub glukozy) oraz azotu ogólnego, natomiast brak w dyskusji omówienia otrzymanych wyników, proszę o ich krótkie przedstawienie
- W pracy obserwowano zależności pomiędzy poborem tlenu przez drobnoustroje a obecnością mikrocząstek, czym może być spowodowane to zjawisko i czy są doniesienia literaturowe na ten temat
- Czy podejmowano próby wydłużenia hodowli grzybowych (*A. terreus*, *P. rubens*) do czasu kiedy następuje zmniejszone zapotrzebowanie na tlen

5. Wniosek końcowy

Podsumowując chciałbym zaznaczyć, że badania przeprowadzone przez mgr inż. Annę Kowalską przyczyniły się do poszerzenia wiedzy z zakresu rozwoju grzybów strzępkowych o różnych mechanizmach tworzenia form morfologicznych w hodowlach węglnych i

sterowania morfologią tychże mikroorganizmów poprzez dodatek mineralnych mikrocząstek. Tematyka rozprawy doktorskiej jest aktualna i ważna. Doktorantka zrealizowała cele postawione w pracy. Oryginalne wyniki zostały poddane poprawnej analizie i wyciągnięto właściwe wnioski. Stwierdzam więc jako recenzent, że praca doktorska mgr inż. Anny Kowalskiej, zatytułowana "Wpływ dodatku mineralnych mikrocząstek na rozwój form morfologicznych grzybów strzępkowych w hodowlach wgłębnych" odpowiada warunkom Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i spełnia w pełni wymagania stawiane rozprawom doktorskim w dziedzinie nauk technicznych, dyscyplinie inżynieria chemiczna. Występuję zatem do Wysokiej Rady Wydziału Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska Politechniki Łódzkiej z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Kowalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto biorąc pod uwagę duży nakład pracy Doktorantki, nowatorstwo wyników badań, sposób ich przedstawienia i interpretacji wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

