

Poznań, 30.10.2020 r.

Dr hab. inż. Jadwiga Zabielska-Matejuk
Łukasiewicz-Institut Technologii Drewna
60-654 Poznań
ul. Winiarska 1

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Ewy Lisieckiej

pt. „Odporność czynników biodegradacji drewna i materiałów lignocelulozowych na zwalczanie wybranymi metodami fizycznymi”

Promotor rozprawy: dr hab. Piotr Witomski
Promotor pomocniczy: dr inż. Bogusław Anders

Podstawa opracowania recenzji: pismo Dyrektora Instytutu Nauk Drzewnych i Meblarstwa SGGW w Warszawie, prof. dr hab. Pawła Kozakiewicza z dnia 31.08.2020 r.

Ocena merytoryczna pracy

Praca liczy 134 strony, 7 rozdziałów włącznie z literaturą. Ogółem zamieszczono 74 tabele, 7 wykresów, 33 fotografie. Bibliografia liczy 243 pozycje.

Praca podzielona jest na 6 rozdziałów głównych. Część teoretyczna (przeгляд literatury) obejmuje 29 stron, część eksperymentalna 69 stron. Po stronie tytułowej rozprawy zamieszczono streszczenie, spis treści oraz wstęp i zakres pracy.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska dotyczy zagadnienia odporności wybranych mikroorganizmów biodegradujących drewno i materiały lignocelulozowe, w postaci grzybów i owadów na działanie czynników fizycznych służących ich zwalczaniu. Na wstępie Autorka wskazała, że w trosce o środowisko następuje odwrót od wykorzystania środków chemicznych do zwalczania mikroorganizmów na rzecz mniej szkodliwych metod fizycznych do dezynfekcji i dezynsekcji drewna i materiałów lignocelulozowych. Zagrożenie obiektów zabytkowych (artefaktów, archiwów, zbiorów bibliotecznych, sal wystawowych) przez mikroorganizmy wymaga kosztownych nakładów finansowych na dezynfekcje w celu ocalenia cennych zbiorów. Celem badań Autorki było poszukiwanie skutecznych, mało inwazyjnych sposobów do walki z drobnoustrojami metodami fizycznymi, które pozwoliłyby obniżyć koszty zabiegów dezynfekcji i dezynsekcji i ułatwić proces ratowania drewnianych i lignocelulozowych zabytków. W oparciu o wyznaczony cel pracy Autorka

skoncentrowała się na badaniach owadów występujących najczęściej w muzeach, skansenach, bibliotekach, takich jak kołatek domowy, żywiak chlebowiec i mącznik młynarek oraz grzybów pleśniowych i podstawczaków. Dobór gatunków grzybów uwzględniał grzyby rozkładu brunatnego: *Coniophora puteana* i *Serpula lacrymans* oraz białego *Trametes versicolor*, jak również grzyby strzępkowe *Aspergillus niger*, *Alternaria tenuis*, *Trichoderma viride*, *Paecilomyces variotii* i *Chaetomium globosum*. Grzyby pleśniowe dzięki formom morfologicznym w postaci zarodników i przetrwalników (chlamidospory) są gatunkami bardzo odpornymi na niekorzystne warunki zewnętrzne, z tego względu zastosowanie ich jako mikroorganizmów testowych jest jak najbardziej prawidłowe. W pracy Autorka założyła trzy metody fizyczne zwalczania mikroorganizmów: temperaturę zmieniającą się w szerokim zakresie od 40 °C do 80 °C oraz -70°C i -20°C, podciśnienie 100 mbar, łączne stosowanie niskich temperatur i podciśnienia, jak również sterylizację radiacyjną (wysokoenergetyczne elektrony) o dawce od 1 kGy do 18 kGy. Metody te zostały zastosowane w różnych interwałach czasowych. W zakresie pracy Autorka pominęła opisaną w części metodycznej pracy metodę łącznego stosowania ciśnienia 0,1 mbar oraz temp. -50°C opisaną w punkcie 4.2.8. rozprawy.

Rozdział 3 to przegląd literatury związanej z prowadzonymi badaniami, zawarty w dziesięciu podrozdziałach, obejmujący 32 strony. Zawarto w nim informacje na temat biodegradacji drewna i materiałów lignocelulozowych wymieniając jako najważniejszych sprawców grzyby i owady. W podrozdziałach dotyczących grzybów omówiono ich występowanie, budowę morfologiczną, sposoby rozmnażania, scharakteryzowano grzyby podstawkowe i grzyby pleśniowe w aspekcie różnic w deprecjacji i degradacji drewna i materiałów lignocelulozowych. W oparciu o liczne cytowania literaturowe z ostatniego dziesięciolecia przedstawiono metabolizm działania poszczególnych gatunków grzybów zastosowanych w części doświadczalnej rozprawy doktorskiej, wymagania środowiskowe (wilgotność, temperatura, pH podłoża) sprzyjające rozwojowi grzybów i porażaniu przez nie materiałów technicznych i obiektów zabytkowych (m.in. regały drewniane, rzeźby, książki, papier, obrazy opakowania).

W kolejnym podrozdziale przeglądu literatury przedstawiono szkodniki owadzie występujące w strefie umiarkowanej: spuszczel pospolity, kołatek domowy, mącznik młynarek, żywiak chlebowiec, charakteryzując warunki rozwoju oraz szkody czynione przez żerowanie w drewnie, księgozbiorach, obiektach zabytkowych, skansenach, obiektach sakralnych i in. Opis metod chemicznych i fizycznych stosowanych do zwalczania czynników biodegradacji, zawarty na 19 stronach, stanowi poważną część przeglądu biograficznego rozprawy doktorskiej. Autorka wymieniła liczne przykłady środków chemicznych stosowanych w konserwacji obiektów zabytkowych, zwracając uwagę na ograniczenia aplikacji produktów biobójczych dyrektywą Parlamentu

Europejskiego 98/8/EC. W tym miejscu, w przypadku pentachlorofenolu napisano, że może być on stosowany w zabiegach konserwatorskich w ograniczonej ilości, co nie jest zgodne ze stanem faktycznym. Środki uwalniające formaldehyd, z uwagi na wysoką toksyczność i kancerogenność, również zostały zakazane, na co zwrócono uwagę w rozprawie. Sporo miejsca w rozważaniach Autorka poświęciła środkom chemicznym pochodzenia naturalnego, m.in. olejkom eterycznym produkowanym przez rośliny, które są bezpieczne dla środowiska. Zabrakło tutaj niestety zacytowania prac z ostatniego pięciolecia, dotyczących działania biobójczego flawonoidów, kofeiny, aldehydu cynamonowego, mentolu i innych związków produkowanych przez rośliny. W rozdziale dotyczącym fumigacji dzieł sztuki czy obiektów drewnianych słusznie zwrócono uwagę na ograniczenia wykorzystania gazów, które muszą spełniać szereg rygorystycznych wymagań. Zakaz stosowania bromku metylu i ograniczenie innych gazów toksycznych (fosforowodoru, czy tlenu etylenu) wymusiło na konserwatorach stosowanie gazów niereaktywnych takich jak azot, argon, dwutlenek węgla, co jak zauważyła Autorka przedłużyło proces fumigacji do 7 dni.

W podrozdziale dotyczącym fizycznych metod zwalczania grzybów i owadów opisano wpływ niskich i wysokich temperatur na mikroorganizmy, wpływ zmiany ciśnienia, zwłaszcza podciśnienia na ich śmiertelność. Wykorzystanie promieniowania gamma do sterylizacji radiacyjnej jest znanym zagadnieniem, opisanym w literaturze przedmiotu, jednakże w przypadku zwalczania mikroorganizmów na papierze zauważa się jego żółknięcie, zmniejszenie wytrzymałości oraz stopnia polimeryzacji celulozy, co ogranicza stosowanie tego procesu do konserwacji zbiorów bibliotecznych. Autorka przytoczyła 12 pozycji bibliograficznych dotyczących wykorzystania procesu liofilizacji w konserwacji drewna zabytkowego (Muzeum Archeologiczne w Biskupinie) i zbiorów bibliotecznych zalanych podczas powodzi czy gaszenia pożarów. Przedstawiony w rozprawie przegląd bibliograficzny należy ocenić pozytywnie jako przedstawiający ważne pozycje literaturowe z zakresu odporności czynników biodegradacji drewna i materiałów lignocelulozowych (grzybów i owadów) na zwalczanie metodami fizycznymi i chemicznymi.

Rozdział 4 pracy obejmujący 17 stron tekstu poświęcony został metodyce badań. Na wstępie Autorka przedstawiła materiał badawczy, tj. materiał biologiczny i opis próbek badawczych drewna i papieru.

Dobór gatunków grzybów i owadów do badań przedstawiono w pierwszej części recenzji rozprawy doktorskiej. Na fotografiach 1-15 przedstawiono wzrost grzybów w szalkach Petriego oraz zdjęcia mikroskopowe zarodników grzybów pleśniowych, natomiast na fot. 16-18 przedstawiono hodowle owadów przygotowanych do badań. Opis procedur badawczych, takich jak określenie liczby zarodników pleśni, ustalenie najkorzystniejszej wilgotności próbek do hodowli grzybów, badania przewodności i pojemności cieplnej drewna nie budzi uwag. W kolejnych podrozdziałach opisano szczegółowo ilość próbek

badawczych, procedury badawcze zawierające warianty czasowe oraz parametry temperatury i podciśnienia stosowane w doświadczeniach. Opis wpływu poszczególnych wartości ciśnienia i temperatury na zwalczanie grzybów i owadów jest czytelny i pozwala na łatwą analizę uzyskanych wyników badań.

Kryteria oceny skuteczności metod sterylizacji grzybów i owadów zostały precyzyjnie opisane przez Autorkę. W metodyce badań zastanawia stosowanie bardzo wysokich dawek 18 kGy do sterylizacji radiacyjnej, ponieważ z literatury wynika że dużo mniejsze dawki są skuteczne w uśmiercaniu mikroorganizmów.

Założenie badań spektrometrycznych w podczerwieni w celu określenia zmian zachodzących w wiązaniach peptydowych w strukturze białek ścian komórkowych grzybów pod wpływem wysokiej temperatury, jak również innych zmian struktury związków np. β -glukanu, chityny, lipidów, glikogenu i innych substancji z których zbudowana jest zarodnikująca grzybnia, są bardzo interesujące. Jednak w rozdziale „ Wyniki badań oraz dyskusja” nie dokonano interpretacji uzyskanych widm w podczerwieni, co uniemożliwia prawidłową (pełną) interpretację zmian zachodzących w strukturze chemicznej organeli badanego gatunku grzyba pod wpływem temperatury.

Rozdział 5, najobszerniejszy, obejmujący 48 stron maszynopisu, poświęcony jest przedstawieniu i omówieniu wyników badań. W pierwszym ich etapie Doktorantka określiła liczbę zarodników grzybów pleśniowych, stwierdzając, że największą liczbę zarodników wytworzył gatunek *Trichoderma viride* (62×10^5). Pozostałe gatunki zarodnikowały z 4-krotnie mniejszą intensywnością, co jest właściwością tych organizmów i warunkami hodowli. W badaniach nad wilgotnością, gęstością i przewodnictwem cieplnym w tabeli 5 podano jako optymalną wilgotność materiału dla rozwoju *Serpula lacrymans* 30%. Czy to jest wilgotność względna czy bezwzględna? Optymalna wilgotność drewna (podłoża) dla rozwoju poszczególnych gatunków grzybów podawana jest zwykle w przedziale np. $\pm 2\%$. W tabeli 5 tego nie uwzględniono. W tabeli 6 nie sprecyzowano wilgotności (bezwzględna) . Z wykresu 2 można założyć, że chodzi o wilgotność bezwzględną.

Przedstawione w pracy wyniki działania podciśnienia na trzy gatunki owadów pozwoliły zróżnicować odporność poszczególnych gatunkach, wyrażoną czasem koniecznym do uśmiercenia larw. 100 - procentowa śmiertelność owada *Anobium punctatum* nastąpiła dopiero po 48godzin działania podciśnienia 100 mbar. W przypadku badań zachowania się grzybów podstawczaków i grzybów pleśniowych w warunkach obniżonego ciśnienia nie stwierdzono, w założonych interwałach czasowych, negatywnego oddziaływania na te organizmy, co było łatwe do przewidzenia w oparciu przytoczone pozycje literaturowe. Kolejnym parametrem fizycznym zastosowanym do uśmiercania owadów były niskie temperatury -20°C i -70°C . Uzyskano pozytywne wyniki dla tych organizmów zmienno cieplnych, zróżnicowane dla poszczególnych gatunków testowych. Autorka porównała wyniki tych badań z przedstawionymi w literaturze,

stwierdzając, że rozbieżności mogły być spowodowane różnym wiekiem larw. W pracy słusznie stwierdzono, że niskie temperatury mogą być wykorzystane do zwalczania owadów w wielu pracowniach konserwatorskich i innych obiektach jako ekonomicznie opłacalne rozwiązanie. Natomiast ta metoda fizyczna nie została potwierdzona jako skuteczna w niszczeniu zarówno trzech gatunków grzybów podstawczaków jak i testowych grzybów pleśniowych. Dyskusja wyników własnych przeprowadzona przez Doktorantkę z przykładami badań opisanych w literaturze wskazała, że nie należało oczekiwać innych efektów działania ujemnych temperatur na grzyby testowe. Nasuwa się pytanie, czy warto było zaplanować w pracy doktorskiej badania, na przykładzie grzyba *Serpula lacrymans* pochodzącego z Himalajów, których wynik negatywny (brak skuteczności temperatur -20°C i -70°C w zwalczaniu grzybów) był łatwy do przewidzenia. Opisany proces liofilizacji (temperatura -50°C , podciśnienie 0,1 mbar) skutecznie uśmiercił (100% śmiertelność) owady już po 4 lub 8 godzinach. Doktorantka w kolejnym podrozdziale pracy wykazała, że zarówno proces liofilizacji jak i tyndalizacji nie spowodował uśmiercenia grzybów zarówno zarodnikujących (pleśniowych) jak i podstawkowych. Takich wyników należało oczekiwać, ponieważ kultury grzybów często przechowywane są w formie zliofilizowanej i ta forma jest w sprzedaży w znanych światowych kolekcjach mikroorganizmów. Działanie wysokich temperatur zarówno przy zastosowaniu ciśnienia atmosferycznego jak i podciśnienia dały podobny efekt letalny wobec grzybów pleśni i grzybów podstawkowych. Autorka zwróciła uwagę, że czas konieczny do uśmiercenia grzybni jest odwrotnie proporcjonalny do wysokości temperatury. W tabelach 63-71 przedstawiono dawki promieniowania gamma niezbędne do uśmiercenia grzybów. Interesujący jest fakt, że grzyby podstawkowe są mniej odporne na promieniowanie gamma niż grzyby pleśniowe. Jednak Doktoranta zarówno w dyskusji wyników jak i w podsumowaniu nie podjęła próby interpretacji tych wyników.

W podrozdziale dotyczącym szybkości oddawania wilgoci przez grzyby pleśniowe i podstawkowe (wykresy 3-5), wilgotność grzyba pleśniowego *Alternaria tenuis* była wyższa (80-90%), niż grzyba podstawkowego *Trametes versicolor* (75-80%), co wynika z odmiennych wymagań wilgotnościowych hodowli tych gatunków. Grzyby pleśniowe hodowane są w warunkach 75-80% wilgotności względnej powietrza, natomiast grzyby podstawczaki wymagają 65 % wilgotności. Opis zmian w strukturze białek grzybni, rozerwanie wiązań wodorowych, wiązań van der Waalsa, powstanie z białek czwartorzędowych białek 3 i 2 rzędowych powinien być zamieszczony w kolejnym podrozdziale pracy 5.10. „Spektrometria w podczerwieni”. Jednak, jak wspomniano wcześniej w recenzji w w/w rozdziale nie dokonano opisu i interpretacji chemicznej widm w podczerwieni próbek grzyba *Alternaria tenuis* przed i po działaniu 60°C i 80°C . Przeprowadzono analiza statystyczna rozrzutu pomiarów punktów widm transmitancji grzybów z poszczególnych wariantów badań nie

może być podstawą do formułowania szczegółowych wniosków dotyczących zmian struktury zarodników w wyniku działania temperatury 80 °C.

Zestawienie tabelaryczne dokonane przez Autorkę w podsumowaniu pracy doktorskiej pozwala różnicować skuteczność działania zastosowanych metod fizycznych na mikroorganizmy testowe. Sformułowane wnioski wynikają z uzyskanych rezultatów badań, wyjątek stanowią dwa wnioski dotyczące badań spektrometrycznych zmian struktury w wyniku działania wysokich temperatur. Wymaga to wyjaśnienia i komentarza ze strony Doktorantki.

Uwagi krytyczne

Pod względem edytorskim praca nie została przygotowana starannie, pomimo że zawiera sporo fotografii, wykresów i tabel, także tabel porównawczych ułatwiających czytanie, w rozprawie wielokrotnie (ponad 20-krotnie) zamieszczono błędne nazwy grzybów: *Paecilomyces variotii*, *Penicillium funiculosum*, *Trichoderma viride*, *Chaetomium globosum*, nieprawidłowe taksony grzybów (liczne literówki).

W wielu miejscach pracy nie stosowano kursywy w nazwach łacińskich klas grzybów (str.16), rodzajów grzybów (np. str. 21,22).

Polskie nazwy grzybów pisano nieprawidłowo dużą literą.

Nieprawidłowa nazwa z rodziny *Anobiidae* - brak kursywy (str. 41).

Zauważono brak spracyzowania i przypisu normy PN-EN 113 (str.20).

Na stronie 48 podano wilgotność względną powietrza $\pm 5\%$.

W tabeli 6 podano błędnie jednostkę gęstości drewna w kg/m^3 zamiast g/cm^3

W tabeli 6 nie sprecyzowano wilgotności drewna „wilgotność bezwzględna”.

Na stronie 114 napisano niefortunnie „ciśnienie laboratoryjne”.

Zauważono brak cytowanych pozycji w spisie literatury (np. „ Ashton 2009” - str.16, „Boruszewski 2008 – str. 21).

Brak w literaturze odnośnika dotyczącego Dyrektywy Parlamentu Europejskiego 98/8/EC oraz regulacji Parlamentu Europejskiego 528/2012.

Przedstawione zastrzeżenia i wątpliwości nie umniejszają wartości naukowej ocenianej pracy, aczkolwiek wymagają wyjaśnienia ze strony Doktorantki.

Wniosek końcowy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Ewy Lisieckiej pt. „Odporność czynników biodegradacji drewna i materiałów lignocelulozowych na zwalczanie wybranymi metodami fizycznymi” wykazuje istotne walory poznawcze, w tym umiejętność prowadzenia samodzielnych badań naukowych przez Autorkę. Rzetelnie wykonane badania pozwoliły określić granice odporności testowanych owadów i grzybów oraz i przyczyniły się do powiększenia wiedzy z zakresu skuteczności metod fizycznych w zwalczaniu czynników biodegradacji drewna i materiałów lignocelulozowych.

Na podstawie merytorycznej i formalnej oceny rozprawy doktorskiej mgr inż. Ewy Lisieckiej stwierdzam, że spełnia ona wymagania określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dziennik Ustaw Nr 65/2003 poz. 595 z późniejszymi zmianami). Z całym przekonaniem wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jadwig Zabidaska-Matejka