



POLITECHNIKA POZNAŃSKA
INSTYTUT TECHNOLOGII I INŻYNIERII CHEMICZNEJ
Berdychowo 4, 60-965 Poznań
tel. 61 665-37-16, fax 61 665 36 49
e-mail: lukasz.chrzanowski@put.poznan.pl
prof. dr hab. inż. Łukasz Chrzanowski
Zakład Chemii Organicznej



Poznań, 28.01.2023

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Anny Góralczyk-Bińkowskiej
pt. „Wykorzystanie grzyba *Nectriella pironii* do produkcji lakazopodobnej oksydazy wielomiedziowej i eliminacji toksycznych zanieczyszczeń przemysłu tekstylnego”

Oceniana praca doktorska została wykonana w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Instytutu Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Jerzego Długońskiego oraz promotora pomocniczego dr Anny Jasińskiej.

Podstawa wykonania recenzji

Recenzję wykonałem w oparciu o decyzję Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne z dnia 13 grudnia 2022 roku, a także pisma Przewodniczącej w. w. Komisji Prof. dr hab. Agnieszki Marczak, z dnia 22 grudnia 2022 roku oraz dostarczonego egzemplarza pracy doktorskiej.

Charakterystyka tematyki pracy doktorskiej

Barwniki i pigmenty nadają kolor naszemu życiu. Są wszechobecne i trudno wyobrazić sobie nasz świat bez nich. Towarzyszą nam od samego początku istnienia człowieka. Na początku były to przede wszystkim barwne minerały oraz ekstrakty z roślin. W miarę jak rozwój cywilizacyjny nabierał rozpędu, pojawiła się potrzeba produkcji na dużą skalę syntetycznych związków barwiących. Były one niezbędne do wytwarzania kolorowych tkanin, farb itp. Nietrudno powiązać rozwój chemii, technologii chemicznej, który nastąpił na przełomie XIX i XX wieku z ogromnym wzrostem wytwarzania barwników. Stały się one powszechnie dostępne. W ten globalny trend doskonale wpisuje się historia zakładów Boruta, którego początki sięgają 1894 roku, kiedy zajmujący się barwnikami Jan Śniechowski postanowił wspólnie z dysponującym środkami finansowymi Ignacym Hordliczką założyć fabrykę chemiczną. Przez kolejne 15 lat zdobywali pozycję wśród lokalnych drukarni i farbiarni. Od samego początku występowały problemy ze ściekami, które odprowadzano do Bzury. Niestety nie trudno było zauważyć, że powodowały one uciążliwe i łatwo dostrzegalne zanieczyszczenie wód gruntowych oraz zatrzymywały powietrze, nadając mu specyficzny zapach. Już w roku 1910 rozpoczęto pracę w nowej siedzibie, gdzie na 40 hektarach nieużytków gromadzono najbardziej niebezpieczne odpady produkcyjne. Firma rozwijała się bardzo dobrze i nawet zniszczenia w czasie I czy II wojny światowej nie położyły kresu jej działalności. Stało się to dopiero pod koniec lat 90-tych XX wieku, kiedy stare technologie i duże koszty produkcji nie były w stanie konkurować z barwnikami produkowanymi w innych krajach. Ostatecznie w roku 1999 zakłady postawiono w stan upadłości. Nagromadzone latami odpady produkcyjne spowodowały, że tereny po dawnych zakładach Boruta, stały się jednym z najbardziej skażonych obszarów nawet w skali globalnej. Z jednej strony jest to niesamowity problem, który bezpośrednio oddziałuje na zdrowie okolicznych mieszkańców. Jeżeli jednak będziemy się starać znaleźć jakieś pozytywne strony tej sytuacji, to obecnie jest to unikalne miejsce poszukiwań mikroorganizmów, które dostosowały się do ekstremalnych warunków i potrafią rozkładać barwniki.

Samo zagadnienie usuwania barwników ze środowiska jest jednym z najbardziej eksplorowanych obszarów naukowych ostatnich 30-lat. Wystarczy wpisać kluczowe słowa do baz takich jak Scopus by od

razu dostrzec tysiące prac, które są cytowane również przez tysiące innych badaczy w swoich badaniach.

Naukowcy szukają wydajnych metod fizyko-chemicznych, które niestety nie są idealne i wymagają dużych nakładów finansowych. Ponieważ produkcja tekstylna odbywa się w większości w krajach rozwijających się, środki finansowe są ograniczone. Poszukuje się więc metod biologicznych, ponieważ w powszechnym przeświadczeniu są one tańsze. Jednak wiedza na temat biologicznego rozkładu barwników jest nadal niepełna, a zastosowanie komercyjne mikroorganizmów w bioremediacji skażonego tego typu związkami środowiska jest na wstępnych etapach.

Jak widać z powyższego wprowadzenia, tematyka badawcza podjęta przez Panią mgr Aleksandrę Annę Góralczyk-Bińkowską doskonale wpisuje się w światowe trendy badawcze. Co więcej, jest to idealne wykorzystanie lokalnego i jakże unikalnego w skali światowej skażonego terenu do pozyskania oraz przebadania mikroorganizmów zdolnych do degradacji barwników. Doktorantka skoncentrowała swoją uwagę na wytypowaniu mikroorganizmu cechującego się zdolnością do produkcji enzymu o aktywności lakazy i eliminacji barwników przemysłu tekstylnego, amin aromatycznych oraz wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Ponadto podjęła próbę analizy mechanizmów adaptacji *Nectriella pironii* do toksycznych zanieczyszczeń generowanych przez przemysł tekstylny.

Badania podjęte w niniejszej pracy doktorskiej przyczyniają się do lepszego zrozumienia procesów biotransformacji wybranych ksenobiotyków oraz wzbogacają naszą wiedzę na temat skomplikowanych, wielopłaszczyznowych mechanizmów adaptacyjnych wykorzystywanych przez mikroorganizmy zasiedlające najbardziej skażone nisze środowiskowe. Niniejsza praca doktorska bez wątpienia wnosi wiele elementów nowości naukowej do obecnego stanu wiedzy i jak już wspomniano, doskonale wpisuje się w kierunki badawcze realizowane przez najlepsze ośrodki naukowe.

Formalna ocena pracy doktorskiej

Praca doktorska Pani mgr Aleksandry Anny Góralczyk-Bińkowskiej została zrealizowana i przedstawiona jako cykl trzech spójnych tematycznie prac doświadczalnych oraz jednej pracy przeglądowej:

- Góralczyk-Bińkowska A., Jasińska A., Długoński J. 2019. *Characteristics and use of multicopper oxidases enzymes*, **Advancements of Microbiology**, 58, 1, 7–18
<https://doi.org/10.21307/PM-2019.58.1.007>. IF₂₀₂₁=1,106; IF_{5-letni}=1,955; punkty MEiN=20
- Góralczyk-Bińkowska A., Jasińska A., Długoński A., Płociński P., Długoński J. 2020. *Laccase activity of the ascomycete fungus Nectriella pironii and innovative strategies for its production on leaf litter of an urban park*, **PLoS ONE**, 15, e0233553
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231453>. IF₂₀₂₁=3,752; IF_{5-letni}=4,069; punkty MEiN=100
- Góralczyk-Bińkowska A., Długoński A., Bernat P., Długoński J., Jasińska A. 2021. *Environmental and molecular approach to dye industry waste degradation by the ascomycete fungus Nectriella pironii*, **Scientific Reports**, 11, 23829
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-03446-x>. IF₂₀₂₁=4,997; IF_{5-letni}=5,516; punkty MEiN=140
- Góralczyk-Bińkowska A., Długoński A., Bernat P., Długoński J., Jasińska A. 2022. *Accelerated PAHs transformation in the presence of dye industry landfill leachate combined with fungal membrane lipids changes*, **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 19, 13997
<https://doi.org/10.3390/ijerph192113997>. IF₂₀₂₁=4,614; IF_{5-letni}=4,799; punkty MEiN=140

Zgodnie z informacją podaną przez Doktorantkę, sumaryczny IF₂₀₂₁=16,339, sumaryczny IF_{5-letni}=14,469, a łączna liczba punktów MEiN=400 dla punktacji MEiN według listy obowiązującej w dniu 07.11.2022 r.

Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopismach dobrze rozpoznawalnych wśród naukowców zajmujących się zagadnieniami środowiskowymi. Cieszą się one również dobrą opinią i wiarygodnością naukową.

W szczególny sposób należy podkreślić, że we wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, a to zwyczajowo odpowiada roli osoby wykonującej większość badań laboratoryjnych. Znajduje to pełne potwierdzenie w oświadczeniach przedstawionych na 4 stronach sekcji „Oświadczenia współautorów o udziale w publikacjach”, zgodnie z którymi udział mgr Aleksandry Anny Góralczyk-Bińkowskiej wynosi odpowiednio 70%, 60%, 60% oraz 60% dla prac P1, P2, P3 i P4.

Obecnie realizacja jakichkolwiek badań możliwa jest wyłącznie pod warunkiem dysponowania odpowiednimi środkami finansowymi. Warto więc podkreślić aktywność Doktorantki w kwestii pozyskiwania funduszy i kierowania badaniami w ramach:

- projektu Preludium 14, 2017/27/N/NZ9/02160, przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki; Tytuł projektu: „*Charakterystyka indukcji lakazy grzyba *Myrothecium sp. IM 6443* oraz analiza jej potencjału biodegradacyjnego*”
- dotacji celowej na działalność związaną z prowadzeniem badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich, 5811/E-345/M/2018

Należy podkreślić, że niniejsza rozprawa doktorska jest oparta na bardzo czytelnym zbiorze opublikowanych artykułów, które jasno określają zakres pracy Doktorantki. Liczba artykułów odpowiada również średniej liczbie artykułów podobnych prac doktorskich w międzynarodowym środowisku naukowym i jest w 100% adekwatna do specyfiki prowadzonych badań. Pragnę podkreślić, że jest to bardzo dobrze przygotowana rozprawa w formie zbioru publikacji.

Układ pracy jest typowy dla doktoratów tego typu. Całość pracy zawarto na 124 stronach. Po stronie tytułowej oraz stronie z listą używanych skrótów znajduje się spis treści. Na osobnej stronie wyraźnie wyszczególniono jakie prace stanowią podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora oraz w jakich czasopismach zostały one opublikowane. Podano również wartość współczynnika oddziaływania (IF) oraz punkty ministerialne (MEiN) według stanu na dzień 7 11 2022. Na kolejnej stronie umieszczono informacje o źródłach finansowania zrealizowanych badań. Zwięzłe wprowadzenie do tematyki badawczej zawarto na następnych trzech stronach. Kolejno autor umieścił cele pracy, w ramach których trafnie wyodrębnił następujące zadania badawcze:

- skryning grzybów wyizolowanych z terenu dawnych Zakładów Przemysłu Barwników „Boruta” w Zgierzu wykazujących zdolność do produkcji enzymu o aktywności lakazy i eliminacji barwników przemysłu tekstylnego
- wykorzystanie grzyba *Nectriella pironii* do eliminacji amin aromatycznych i barwników azowych oraz utylizacji odcieków ze składowiska odpadów niebezpiecznych
- eliminacja wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) przez grzyb *N. pironii* w obecności odcieków składowiskowych oraz ustalenie mechanizmów adaptacji grzyba do toksycznych zanieczyszczeń generowanych przez przemysł tekstylny.

Na stronach 10-22 Doktorantka przedstawiła syntetyczny opis realizacji poszczególnych celów pracy. W tej sekcji w bardzo zwarty sposób opisano i podsumowano badania zawarte w pracy P2 przy wykorzystaniu teoretycznego wstępu opublikowanego jako artykuł przeglądowy w pracy P1. Na koniec przedstawiono wnioski i cząstkowe stwierdzenia dotyczące skryningu grzybów wykazujących zdolność do produkcji enzymu o aktywności lakazy i eliminacji barwników. Kolejne trzy strony to adekwatny, syntetyczny opis i podsumowanie wyników opublikowanych w pracy P3 wraz z wyszczególnionymi wnioskami dotyczącymi eliminacji amin aromatycznych i barwników azowych oraz utylizacji odcieków ze składowiska odpadów przez wyselekcjonowany grzyb *N. pironii*. Analogicznie zreferowano eksperymenty i wyniki opublikowane w

pracy P4 a także przedstawiono wnioski dotyczące eliminacji WWA przez *N. pironii* w obecności odcieków ze składowiska odpadów niebezpiecznych oraz mechanizmów adaptacji grzyba do środowiska skażonego tymi odciekami.

Na stronie 23 umieszczono wnioski i stwierdzenia końcowe. Po nich znajduje się 2 stronicowe streszczenie w języku polskim oraz jego odpowiednik w języku angielskim. Strony 28-32 zajmuje zestawienie wykorzystanej w omówieniu literatury. Następnie (strony 33-43) Doktorantka zestawiała spis wszystkich publikacji, rozdziałów w podręcznikach, zestawienie przyznanych nagród i wyróżnień, a także doniesienia konferencyjne wraz z kursami i szkoleniami i pozostałą aktywność. Na stronie 44 jeszcze raz wyszczególniono publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej, co jest uzasadnione, gdyż w dalszej części pracy (strony 45-120) zamieszczono pełne wersje 4 artykułów naukowych wraz z dodatkowymi danymi (**Supplementary Information**). Całość pracy zamykają 4 strony oświadczeń dotyczących udziału współautorów w artykułach naukowych stanowiących podstawę postępowania o nadanie stopnia doktora.

Wprowadzenie oraz omówienie wyników napisane są poprawnym stylistycznie językiem. W sposób szczególny należy podkreślić wielką dbałość o jednolity sposób zapisu jednostek i symboli. Jest to pierwsza rozprawa doktorska, w której Recenzent nie znalazł ani jednego uchybienia w tej kwestii.

Ocena merytoryczna pracy doktorskiej

Podany w doktoracie cel badań jest czytelny i bardzo dobrze koresponduje z obecnym stanem wiedzy. Nie jest tajemnicą, że w chwili obecnej przemysł biotechnologiczny poszukuje nowych enzymów, które będą użyteczne, tanie w produkcji i przyniosą dochód. Dlatego wszelkie badania zmierzające do wyizolowania użytecznych enzymów, będą ważne i pożądane przez środowisko naukowe.

Doktorantka, co należy podkreślić, dokonała wzorowego rozeznania stanu wiedzy w realizowanej tematyce badawczej. Przystudiowała zdecydowaną większość z istotnych publikacji naukowych i dokonała świadomej eliminacji prac para-naukowych. Zdecydowana większość zacytowanych dokumentów pochodzi z ostatnich kilku lat. Jest to również potwierdzeniem faktu, że podjęte badania są nowatorskie i wpisują się w tematykę badawczą realizowaną przez znane międzynarodowe ośrodki badawcze. Ponadto, wśród autorów prac bez trudu można odnaleźć prominentne nazwiska liderów tego typu badań na świecie.

Doktorantka poprzez wnikliwe studia literaturowe mogła, wspólnie z promotorem, zaplanować badania w sposób umożliwiający opublikowanie przyszłych wyników w istotnych czasopismach. Po lekturze prac stanowiących podstawę doktoratu widać wyraźnie, że badania nie są odtwórcze i doskonale uzupełniają obecny stan wiedzy. Trudno oczekiwać, aby poszukiwanie enzymów przełożyło się na rewolucję w świecie nauki, ale analizując zyski firm produkujących enzymy, a także nakłady na poszukiwanie nowych enzymów i ich potencjalnych zastosowań, nie można mieć wątpliwości co do potrzeby prowadzenia takich badań.

Zaprezentowane badania nie są odtwórcze i jak już wspomniałem, wnoszą elementy nowości naukowej, pozwalają na lepsze i pełniejsze zrozumienie mechanizmów adaptacji grzybów do realnych skażeń występujących w miejscach przechowywania odpadów przemysłu barwiarskiego.

Doktorantka wykorzystwała interesujący warsztat badawczy, w pełni odpowiadający potrzebom i zapewniający uzyskanie wiarygodnych wyników. Sam proces wytypowania odpowiedniego grzyba, a następnie jego analiza w prostych układach modelowych, by następnie przejść do bardziej złożonych układów, w których obecne są rzeczywiste skażenia, jest optymalny i zgodny ze wszystkimi standardami naukowymi. Wagę wyników podnosi wyizolowanie odpowiedniego enzymu i jego opis. Ponadto weryfikacja działania w układach rzeczywistych zanieczyszczeń w formie odcieku ze składowiska odpadów niebezpiecznych, przez co od badań modelowych o znaczeniu naukowym Doktorantka przeszła do badań o znaczeniu praktycznym. Wszystkie te etapy wyraźnie pokazują, że badania są całościowo spójne. Nie jest to zbiór przypadkowych eksperymentów, ale zestaw dobrze zaplanowanych badań, które składają się na komplementarną wiedzę uzyskaną przez Doktorantkę i zaprezentowaną w postaci publikacji.

Szczegółowa analiza załączonych prac badawczych wraz z autorskim komentarzem Doktorantki, nasunęła Recenzentowi pewne komentarze, sugestie i pytania:

- strona 16 – „Istotny wzrost stopnia biodegradacji ...” – stopień biodegradacji to niestety często spotykany w pracach naukowych termin, ale zdecydowanie korzystniej używać wyrażenia „efektywność biodegradacji”. Jeżeli chodzi o „istotny wzrost” – lepiej używać wymiernych zwrotów gdyż to co dla jednego naukowca może być istotne, dla innego może być nieistotne. Są to drobne uwagi o charakterze kosmetycznym.
- strona 18 – „Zatem wyższa wartość rozpuszczalności w wodzie Fen w porównaniu z B[a]A i B[a]P może wzmacniać adsorpcję tego związku z podłoża hodowlanego przez grzybnie.” – zdecydowanie lepiej użyć słowa „pobór” niż „adsorbacja”, a także wyrażenia „wyższa rozpuszczalność”
- strona 19 – „odcieki wraz z B[a]An jak i B[a]P, co wskazuje” – chyba jedyne miejsce w pracy gdzie widoczna jest niepotrzebna spacja. Całość pracy doktorskiej jest bardzo starannie przygotowana pod względem edytorskim, na poziomie niespotykanym nie tylko dla doktoratów, ale nawet książek wydawanych przez najbardziej znane wydawnictwa. Chylę czoła, bo po raz pierwszy spotkałem się z taką dbałością o szczegóły.
- Strona 20 – „wynosiła odpowiednio 59,98 i 68,43%.” - przy wartościach procentowych nie ma potrzeby takiej dokładności, dlatego zdecydowanie lepiej zaokrąglić liczby do wartości pokazujących trendy. Uwaga czytelnika kierowana jest wtedy na liczby 60 i 68%, a miejsca po przecinku nie mają żadnego znaczenia. Doktorantka w większości pracy podaje wartości procentowe zgodnie z sugestią Recenzenta, ale w kilku miejscach można odnaleźć niepotrzebną dokładność.
- Strona 20 – „Równocześnie wykonywane analizy zawartości kwasów tłuszczowych tworzących cząsteczki fosfolipidów (ang. phospholipid fatty acids, PLFAs) ujawniły zmiany w ich nasyceniu w obecności Fen. Zmniejszeniu uległa zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych PC 18:2/18:2; PE 18:2/18:2 i PE 18:2/18:1 przy jednoczesnym wzroście zawartości kwasów nasyconych PC 16:0/18:2 i PC 16:0/18:1, co wskazuje na wzrost integralności błony. W oparciu o uzyskane wyniki wykazano, iż kwas palmitynowy (C16:0) był najbardziej dominującym nasyconym kwasem tłuszczowym, podczas gdy wśród nienasyconych były to kwas oleinowy (C18:1) i kwas linolowy (C18:2).” - warto było by skorelować to wnioskiem z eksperymentem wykorzystującym indykator stosowany do sprawdzenia integralności membran komórkowych np. Trypan Blue, Neutral Red, Fluorescent Propidium Iodide
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.12.010>
- Strona 21 – „Badany szczep jest w stanie eliminować trzy-, cztero i pięciopierścieniowe WWA, a dodatek odcieków do hodowli przyspiesza tempo biodegradacji Fen, B[a]A i B[a]P.” – może bardziej odpowiednim słowem byłaby biotransformacja? Biodegradacja w języku polskim jest dość niejasna i może odnosić się do wstępnych etapów enzymatycznej obróbki danego ksenobiotyku jak i całkowitego utlenienia do CO₂ czyli odpowiednio do primary biodegradation lub ultimate biodegradation (mineralizacja). W przypadku WWA najczęściej obserwujemy biotransformację, choć bez problemu znajdzie także gatunki zdolne do wzrostu na mniej skomplikowanych wariantach WWA, jako jedynym źródle węgla.
- Strona 24 – „Z powodu nieskuteczności procesów technologicznych do środowiska może przedostawać nawet do 50% substancji stosowanych w barwieniu.” – może nawet nie chodzi o skuteczność, ale o maksymalizację zysków. Możemy skonstruować prawie idealny proces i instalacje, ale koszty finalne produktu będą niekonkurencyjne w stosunku do typowych instalacji. Niestety godzimy się na to aby wspierać takie tanie rozwiązania kupując ogromne ilości

niepotrzebnych ubrań.

- Praca 1 – Bardzo ciekawy artykuł pozwalający na dobre zapoznanie się z enzymami z grupy wielomiedziowych oksydaz. Z jednej strony można rozważać, czy *Postępy Mikrobiologii* to wiodące czasopismo z listy filadelfijskiej, ale z drugiej, ważniejszej strony, jest ono łatwo dostępne i cieszące się dużą poczytnością w polskich warunkach. W pracy Doktorantka jest pierwszym autorem i z pewnością była zaangażowana w przygotowanie i odpowiednie wyselekcjonowanie najważniejszych informacji. Drobne uwagi dotyczą Tabeli II. Warto ujednoczyć jednostki i przeliczyć tak aby mg nie były przemieszane z mM. Ponadto zawsze należy podawać początkowe stężenie analizowanego związku, gdyż to do tej wartości odnosi się biodegradacja podana w procentach. Gdy brakuje początkowego stężenia, to procenty nie mówią nam absolutnie nic. Warto także wprowadzić dodatkowe kolumny z autorskim komentarzem do opisanych badań. Przykładowo bardzo cenna będzie informacja czy autorzy analizowali dalsze losy produktów wstępnej biotransformacji barwników, jakie wiązanie było atakowane itp. Autorzy mają prawo wskazać mocne i słabe strony opisywanych prac. Pod takimi rozbudowanymi tabelami można również dokonać zbiorczego opisu obecnych trendów badawczych i równocześnie wskazać nowe kierunki badań. Można wtedy unikać pokazywania w treści informacji o małym znaczeniu np.: „For example, a crude extract of the laccase derived from the fungus *P. nebrodensis* has shown effective decolorization (82.69%) of malachite green after just one hour of incubation [99].” Jak wspomniałem powyżej, takie zdania nie przekazują żadnej istotnej treści gdyż nie wiemy jakie było początkowe stężenie analizowanego barwnika. Zdecydowanie lepiej umieszczać takie badania w tabelach z odpowiednim komentarzem oraz od razu zaokrąglić liczby do istotnych wartości. Taka strategia pozwala na publikowanie artykułów przeglądowych w najbardziej pożądanym czasopiśmie.
- Praca 2 – Idealny tytuł, w którym autorzy nie podają specyficznych numerów szczepu. Jednym z najczęstszych błędów jest umieszczanie w tytule numerów lub oznaczeń szczepów, które nie mówią nic potencjalnemu czytelnikowi, a co przekłada się od razu na mniejszy entuzjazm do zapoznania się z resztą manuskryptu.
- Praca 2 - Wykorzystanie liści jako materiału zawierającego związki fenolowe celem zwiększenia produkcji odpowiednich enzymów jest bardzo trafnym i ciekawym rozwiązaniem. Autorzy podają: „Till date, especially agricultural waste such as fruit peels, cereal bran, and straw or oil cakes have been successfully used for laccase production.” Oczywiście jest to prawdą, ale w wielu przypadkach takie odpady należy gromadzić i koszty transportu są za wysokie, a zaproponowane rozwiązanie nie ma żadnego potencjału ekonomicznego. Doktorantka zdecydowanie trafniej wybrała substrat, gdyż liście muszą być usuwane z terenów miejskich, co od razu zmniejsza koszty. Ponadto liście muszą być przetworzone, poddane kompostowaniu itp. Przy okazji można pewne szarże wykorzystać do produkcji biotechnologicznej. Szkoda, że Doktorantka nie dokonała prostego oszacowania kosztów takiej produkcji. Istnieją modele, które można było tutaj wykorzystać, co zdecydowanie było by cennym przykładem dla wielu czytelników. Tym bardziej, że dokonano już wstępnego oszacowania potencjału gromadzenia liści: „... an estimated 0.8 Mg of leaf bio-waste (fresh matter) can be obtained from one adult urban tree on a yearly basis. By averaging these statistical data, it can be evaluated that about 5.4 Mg of wet leaf litter can be provided annually by adult trees of *A. hippocastanum* L. and *P. simonii* “Fastigiata” growing in the studied area (the Plac Komuny Paryskiej pocket park).”
- Praca 2 - „However, few studies indicate synergistic stimulation of laccase production by metal ions and aromatic compounds [9, 10].” – Prowadzenie eksperymentów w realnych warunkach, w których występują mieszaniny ksenobiotyków jest niezmiernie ważne. Opublikowano wiele prac wykorzystujących jeden typ ksenobiotyku jako modelowe zanieczyszczenie. Problemem jest to, że takie sytuacje są nierealne i bardzo rzadko spotykane w środowisku. Najczęściej mamy do

czynienia z wieloma ksenobiotykami, których toksyczne działanie nakłada się na siebie. Dlatego należy docenić taki wybór Doktorantki, przez co opublikowana praca wpisuje się w najnowsze trendy badawcze.

- Praca 2 – Trochę szkoda, że autorzy nie podjęli wyzwania oznaczenia produktów dekoloryzacji za pomocą bardziej wyrafinowanych metod, np. HPLC-MS. Rozumiem, że do skringingu wystarczy prosta i tania metoda UV, ale warto byłoby się do tej kwestii odnieść w treści pracy.
- Praca 2 – Tabela 1 – Chyba korzystniej byłoby przenieść ją do ESI, gdyż najważniejsza jest uniwersalna wiadomość płynąca z tego zestawienia, a nie poszczególne wartości. Tabela 2 – nie ma potrzeby podawania inhibicji z dwoma miejscami po przecinku.
- Praca 3 – Świetny raport pozwalający zrozumieć specyfikę skażonego miejsca, procesu uwalniania zgromadzonych substancji oraz charakteryzujący zdolności grzyba wyselekcjonowanego w pracy 2. Badania zostały zaprojektowane tak aby ocenić możliwości grzyba do eliminacji amin aromatycznych i barwników azowych. Doktorantka udowodniła, że o-tolidyna obecna w odcieku, była przekształcana do 3,3'- dihydroksybenzydyny. Ta praca jest naturalną kontynuacją pracy 2.
- Praca 3 - Najważniejszym elementem wpływającym na wartość poznawczą tej publikacji są badania dotyczące zdolności *Nectriella pironii* do wzrostu w rzeczywistych układach zanieczyszczeń. Można prowadzić wiele badań stosując układy modelowe ale dopiero wykorzystanie prawdziwych próbek pozwala na wstępną weryfikację potencjalnych zdolności mikroorganizmów do komercyjnych zastosowań. Oczywiście jest to dopiero pierwszy krok, ale z punktu widzenia komplementarności przedstawionych w niniejszym doktoracie badań, niezmiernie istotny. Wybrane miejsce i odcieki są doskonale dobrane i aż prosi się o kontynuację badań w skali pół-technicznej.
- Praca 4 – Badania zaprezentowane w tej pracy stanowią idealne zakończenie cyklu publikacji. Identyfikacja mechanizmów adaptacji *N. pironii* do zanieczyszczeń takich jak WWA w obecności odcieków z omawianego składowiska odpadów niebezpiecznych, stanowi doskonale uzupełnienie obecnego stanu wiedzy. Jak już wcześniej wspominałem, prowadzenie badań z wybranym ksenobiotykiem i wnioskowanie co do komercyjnego wykorzystania danego mikroorganizmu, co niestety jest nagminne w wielu pracach naukowych, jest nieuzasadnionym optymizmem, czy nawet spekulacją. W rzeczywistych układach takie mikroorganizmy najczęściej nie są w stanie przetrwać, nie mówiąc już o prowadzeniu procesów oczyszczania. Dlatego należy podkreślić, że Doktorantka realizuje bardzo dobrze zaplanowane eksperymenty, które wpisują się w najnowsze trendy badawcze. Krok po kroku, komplikuje układ badawczy i udowadnia, że *N. pironii* nawet w obecności wielu zanieczyszczeń, nadal zachowuje swoją aktywność metaboliczną i zdolność do rozkładu ksenobiotyków.
- Praca 4 - Uzyskane wyniki wykazały, iż badany szczep jest w stanie eliminować trzy-, cztero- i pięciopięścieniowe WWA. Ponadto, wprowadzenie odcieków do hodowli przyspiesza tempo biodegradacji fenantrenu (Fen), benz[a]antracenu (B[a]A) i benz[a]pirenu (B[a]P). W tym miejscu chciałbym zapytać Doktorantkę czy możemy sformułować generalne stwierdzenie, że grzyby posiadają bogaty zestaw enzymatyczny, ale nakierowane są na wstępne biotransformacje szeregu ksenobiotyków bez zdolności do mineralizacji tych związków. Natomiast bakterie zdecydowanie częściej potrafią wykorzystywać metabolity grzybów, jako jedyne źródło węgla. Dzięki temu szybko rosnące grzyby, zapewniają bakteriom źródło węgla, a bez grzybów, bakterie miałyby mniejsze szanse na przeżycie. Jakie jest zdanie Doktorantki w tej kwestii? Czy się zgadza? Czy może jest to zbyt wielkie uproszczenie? Pytam się w kontekście planowania badań związanych z

degradacją barwników w warunkach środowiskowych. Czy i jak często opisywano bakterie zdolne do degradacji barwników?

- Praca 4 – Czy Doktorantka może odnieść się do mojego komentarza dotyczącego indyktorów stosowanych do sprawdzenia integralności membran komórkowych (strona 20).
- Praca 4 – „Hence, the exploitation of real matrices (soil or sewage) in studies regarding the removal of PAHs contributes to better predictions of their action.” – lepiej używać słowa “próbki środowiskowe”. Zgodnie ze słownikiem PWN: - “matryca - w chemii analitycznej termin określający wszystkie składniki próbki analitycznej poza składnikiem oznaczanym, tj. analitem; wpływ, który mogą wywierać współobecne w próbce składniki na oznaczenie analitu nazywa się efektem matrycowym.”. Ponieważ nie chodzi o zagadnienie wiarygodności oznaczania WWA w różnych próbkach, np. nie analizujemy krzywej wzorcowej i granic detekcji, to lepiej używać terminu próbki wodne, próbki glebowe w kontekście wspomnianym przez Doktorantkę.
- Praca 4 – „For example, Partovinia and Naeimpoor [28] showed the entire biodegradation of PHE (250 ppm) after 7 days using FC and IC of a microbial consortium ...” – autorzy wspomnianej publikacji błędnie stosują termin konsorcjum, używając go do określenia “mixed culture”.
- Praca 2, 3 i 4 - Bardzo doceniam, że zaplanowane badania są spójne i wzajemnie się uzupełniają. Warto również podkreślić, że Doktorantka prowadzi dojrzałą dyskusję naukową opierając się wyłącznie na faktach. W żadnym momencie nie spekuluje i nie wykazuje tendencji do nadinterpretowania uzyskanych danych. Liczą się tylko fakty potwierdzone naukowo. Chciałbym w szczególny sposób zasygnalizować ten fakt, gdyż zasługuje on na wyróżnienie.

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską należy wyróżnić bardzo duży wkład własnej pracy Doktorantki. Należy podkreślić, że jest to praca przemyślana, wymagająca umiejętności praktycznych oraz doskonale zinterpretowana. Jest to również bardzo dobra praca doktorska zrealizowana w formie zbioru publikacji opatrzonej komentarzem autorskim.

W sposób szczególny pragnę również wyróżnić ogromne zaangażowanie Doktorantki, która była aktywna nie tylko w realizację zaplanowanych badań. Oprócz 4 publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, Doktorantka jest również współautorem 7 innych prac z listy filadelfijskiej oraz 13 rozdziałów w książkach i podręcznikach. Ponadto 26 razy referowała wyniki na konferencjach zagranicznych i krajowych. Przez okres 3 miesięcy zdobywała doświadczenie w Laboratorium Biochemii Uniwersytetu w Wageningen, Holandia. Ponadto jest członkiem PTM, a od 2020 sekretarzem Sekcji „Micromycetes w ochronie zdrowia, środowiska oraz w przemyśle”. Jeżeli doliczymy to tego udział w krótszych wyjazdach szkoleniowych, warsztatach, działalność organizacyjną to jawi się nam sylwetka osoby bardzo prężnie działającej na wielu ważnych obszarach determinujących sukces w nauce. Nie dziwi więc fakt, że Jej aktywność została uhonorowana przyznaniem Nagrody zespołowej Ministra Edukacji i Nauki (2022) a także Nagrody II stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Łódzkiego (2017).

Bardzo wysoko oceniam niniejszą rozprawę doktorską pod względem merytorycznym i wnoszę do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o jej wyróżnienie.

Uzasadnienie wyróżnienia

W niniejszej pracy doktorskiej należy w sposób szczególny zwrócić uwagę na następujące kwestie:

- doskonale przygotowanie merytoryczne Doktoranta w obrębie tematyki badawczej i zaangażowanie w prowadzenie eksperymentów, czego dowodem jest pozycja Doktorantki jako

pierwszego autora we wszystkich pracach.

- merytoryczna i dojrzała dyskusja naukowa poparta we wzorowy sposób własnymi wynikami badań.
- komplementarność wszystkich prac wchodzących w zakres doktoratu, dzięki czemu Doktorantka rozwinęła się naukowo. Doktorantka rozumie i płynnie porusza się w problematyce będącej przedmiotem badań. Wykorzystuje specjalistyczne i aktualne źródła informacji, potrafi planować i prowadzić badania naukowe. Posiada zdolność interpretacji uzyskanych wyników oraz krytycznej analizy. Bez tych elementów prace byłyby niespójne a czasem nawet wewnętrznie sprzeczne.
- bardzo dużą aktywność w wielu obszarach naukowo-organizacyjnych. Z pewnością Doktorantka należy do bardzo nielicznej grupy tak prężnie działających naukowców w swojej grupie wiekowej.

Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe aspekty, które składają się na bardzo dobrą, nowoczesną pracę doktorską, wnoszącą dużo elementów nowości naukowej do nauk biologicznych, wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej pracy.

Wniosek końcowy

Analizując niniejszą pracę doktorską pod kątem aktualności i oryginalności podjętych badań można z całą pewnością stwierdzić, że Autorka z sukcesem odnalazła swoją niszę badawczą, a zrealizowane przez nią badania będą interesujące dla szeregu naukowców zainteresowanych usuwaniem barwników oraz adaptacją mikroorganizmów do obecności różnorodnych mieszanin ksenobiotyków.

Reasumując, przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską mgr Aleksandry Anny Góralczyk-Bińkowskiej pt. **„Wykorzystanie grzyba *Nectriella pironii* do produkcji lakazopodobnej oksydazy wielomiedziowej i eliminacji toksycznych zanieczyszczeń przemysłu tekstylnego”** oceniam bardzo pozytywnie oraz stwierdzam, że spełnia ona wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim procedowanym na podstawie Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. Ponadto, praca stanowi oryginalne rozwiązanie zagadnienia naukowego oraz wykazuje niezbędną ogólną wiedzę teoretyczną Autorki i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej dlatego wnoszę o dopuszczenie mgr Aleksandry Anny Góralczyk-Bińkowskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Z poważaniem,



prof. dr hab. inż. Łukasz Chrzanowski