

Prof. dr hab. inż. Marcin Bizukojć  
Politechnika Łódzka  
Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska  
Katedra Inżynierii Bioprocessowej

Łódź, 15 grudnia 2022 r.

### **Recenzja rozprawy doktorskiej**

Autor: mgr Marta Nowak-Lange

Tytuł: „Mikrobiologiczna eliminacja oraz toksyczność środowiskowa metyloizotiazolinonu i chloroksylenolu”

Promotor: prof. dr hab. Katarzyna Lisowka

Podstawą opracowania recenzji jest pismo prof. dr hab. Agnieszki Marczak przewodniczącej Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne z dnia 23 listopada 2022 roku z prośbą o przygotowanie oceny rozprawy doktorskiej mgr Marty Nowak-Lange zatytułowanej „Mikrobiologiczna eliminacja oraz toksyczność środowiskowa metyloizotiazolinonu i chloroksylenolu”. Prośba ta została skierowana zgodnie z decyzją Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne podjętą na posiedzeniu w dniu 22 listopada 2022 roku.

#### **Podstawowe informacje o ocenianej rozprawie doktorskiej oraz ocena jej układu**

Mgr Marta Nowak-Lange przedstawiła rozprawę doktorską zatytułowaną „Mikrobiologiczna eliminacja oraz toksyczność środowiskowa metyloizotiazolinonu i chloroksylenolu” w formie cyklu czterech artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie naukowym o zasięgu międzynarodowym, posiadających *Impact Factor*. Te artykuły zostały uzupełnione o wprowadzenie do tematu rozprawy doktorskiej, sformułowanie celów rozprawy doktorskiej, syntetyczne omówienie treści przedstawionych w cyklu publikacji oraz podsumowanie wraz z wnioskami i literaturą cytowaną. W pracy zostały umieszczone streszczenia w języku polskim i angielskim. Doktorantka przedstawiła także swój pozostały dorobek naukowy, oświadczenia współautorów artykułów naukowych zaliczonych do cyklu artykułów oraz źródła finansowania badań. Układ pracy doktorskiej jest typowy dla rozpraw przedstawianych w postaci cyklu publikacji. Rozprawa doktorska jest w mojej ocenie w kompletna, a jej układ prawidłowy.

#### **Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej**

##### **Uzasadnienie wyboru tematu pracy**

W pierwszej kolejności odniosę się do uzasadnienia wyboru tematu pracy. Nie ma wątpliwości, że wiele zsyntezowanych przez człowieka organicznych związków chemicznych o



szerokich zastosowaniach zarówno w przemyśle chemicznym, spożywczym, kosmetycznym, jak i w medycynie jest ksenobiotykami. Stykamy się z tymi ksenobiotykami w życiu codziennym w preparatach leczniczych, kosmetykach czy nawet w żywności.

Obiektem badań mgr Marty Nowak-Lange były dwa związki chemiczne metyloizotiazolinon i chloroksylenol o ważnej funkcjonalności w życiu codziennym. Są one konserwantami produktów kosmetycznych i zalicza się je składników produktów ochrony indywidualnej *personal care products* (PCP).

Z faktu, że te związki chemiczne są produktem syntezy organicznej i jednocześnie ksenobiotykami wynika, że ich rozkład biologiczny może być utrudniony, wolniejszy, niepełny, a czasem wręcz niemożliwy w środowisku przyrodniczym. Metyloizotiazolinon i chloroksylenol dostają się najczęściej do środowiska po tym, jak kosmetyki je zawierające zostaną zmyte ze skóry. Stężenia tych związków w ściekach surowych i później w środowisku nie wydają się wysokie, zalicza się je wszak do mikrozanieczyszczeń. Jednakże nie jest wykluczone ich niekorzystne działanie na żywe organizmy. Należy tu mocno podkreślić, że konserwanty są związkami silnie biobójczymi o szerokim spektrum działania, bo taka jest ich funkcja w gotowym produkcie. Są one wprowadzane do kosmetyków, aby przedłużyć ich termin przydatności do użycia poprzez uniemożliwienie wzrostu bakterii czy grzybów. Te związki nie tracą swoich biobójczych właściwości po przeniknięciu do ekosystemów i nadal wykazują wysoką toksyczność dla mikroorganizmów. Tego typu związki mogą niszczyć organizmy normalnie odpowiedzialne w przyrodzie za ich potencjalną biodegradację.

Metyloizotiazolinon i chloroksylenol, wybrane przez mgr Martę Nowak-Lange należą do najbardziej toksycznych związków z grupy konserwantów. Na podstawie danych literaturowych potwierdzona została obecność metyloizotiazolinonu i chloroksylenolu w ściekach w różnych krajach na całym świecie oraz w różnych ekosystemach. Co więcej metyloizotiazolinon podejrzewa się o działanie modulatora hormonalnego (*endocrine disrupting compounds, EDCs*). Istnieje dobrze ugruntowana wiedza, że grzyby strzępkowe ze względu na swój bogaty metabolizm mają zdolność do transformowania (przede wszystkim utleniania) wielu związków organicznych, a więc potencjalnie mogą degradować metyloizotiazolinon i chloroksylenol.

Doktorantka postanowiła zbadać zdolność grzybów strzępkowych do usuwania metyloizotiazolinonu i chloroksylenolu. W tym celu znalazła odpowiednie gatunki grzybów. Istotne i godne pochwały jest to, że zanim przystąpiła do badań laboratoryjnych, dokonała szczegółowego przeglądu literatury przedmiotu (publikacja [1] z cyklu) i wykonała analizę wielu prób środowiskowych w celu wykrycia metyloizotiazolinonu w środowisku. Doktorantce udało się udowodnić obecność tej substancji w środowisku na terenie Polski (publikacja [2] z cyklu).

Zatem potrzeba badań nad rozkładem mikrobiologicznym metyloizotiazolinonu i chloroksylenolu z wykorzystaniem grzybów strzępkowych została w najwyższym stopniu uzasadniona i w pełni zgadzam się z tym uzasadnieniem.

### **Ocena sformułowania celu rozprawy doktorskiej**

Cel rozprawy doktorskiej został sformułowany w postaci pięciu następujących punktów, które tu zacytuję:

1. Ocena stężeń środowiskowych metyloizotiazolinonu;
2. Określenie zdolności wybranych grzybów strzępkowych do wzrostu w obecności metyloizotiazolinonu i chloroksylenolu;
3. Analiza potencjału badanych szczepów do eliminacji metyloizotiazolinonu i chloroksylenolu;
4. Określenie mechanizmów biologicznej degradacji metyloizotiazolinonu i chloroksylenolu przez testowane drobnoustroje;
5. Ocena toksyczności badanych konserwantów oraz ich metabolitów wobec organizmów bioindykacyjnych.

Cel został sformułowany logicznie, właściwa jest kolejność poszczególnych punktów. Jest to jednocześnie bardzo dobrze ułożony plan badań. Pierwszy punkt jest uzasadnieniem prowadzenia badań, drugi poszukiwaniem odpowiedniego „narzędzia” do usuwania metyloizotiazolinonu i chloroksylenolu. Trzy kolejne punkty obejmują właściwe badania nad usuwaniem metyloizotiazolinonu i chloroksylenolu przez grzyby strzępkowe oraz toksycznością tych związków i produktów ich rozkładu, co jest tematem rozprawy doktorskiej. Badania te objęły określenie wydajności procesu usuwania tych ksenobiotyków, udzielenie odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób te ksenobiotyki usuwane są przez grzyby strzępkowe oraz ocenę, czy warto było w ten sposób usuwać te substancje w kontekście efektów ubocznych związanych z potencjalnym wzrostem toksyczności wywołanym produktami rozkładu tych związków.

### **Ocena zastosowanych metod badawczych**

Lista zastosowanych metod badawczych przez mgr Martę Nowak-Lange jest długa i wszystko są to zaawansowane analizy z użyciem nowoczesnej i precyzyjnej aparatury. Przede wszystkim były to metody chromatograficzne: chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas, LC-MS/MS, HPLC-MS/MS oraz chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas GC-MS niezbędne w analizie ilościowej usuwania badanych ksenobiotyków oraz wykrywaniu produktów ich rozkładu przez grzyby strzępkowe, a także w analizie profilu fosfolipidowego błon komórkowych wybranych bakterii glebowych w związku z określeniem toksyczności tychże ksenobiotyków.

Podstawowe badania toksyczności metyloizotiazolinonu i chloroksylenolu oraz produktów ich biodegradacji były przeprowadzone za pomocą testów toksykologicznych Daphtoxkit F i Phytotoxkit. Wpływ badanych ksenobiotyków (efekt toksyczny, stan fizjologiczny) na bakterie glebowe był analizowany metodami spektrofotometrycznymi i fluorymetrycznymi. Wreszcie badanie mechanizmu degradacji (udowodnienie udziału cytochromu P450) wymagało zastosowania Real-Time PCR. W mojej opinii wybór technik jest w pełni uzasadniony i bardzo dobrze świadczy o warsztacie

badawczym Doktorantki. Oczywiście należy tu jeszcze wspomnieć o zaawansowanej analizie statystycznej wyników badań, którą również oceniam bardzo wysoko.

### Ocena zastosowanego piśmiennictwa

Mgr Marta Nowak-Lange dokonała rzetelnego przeglądu literatury przedmiotu i dobór piśmiennictwa naukowego uważam za wyróżniający. Lista literatury uzupełniającej związanej z opisem rozprawy doktorskiej obejmuje 25 istotnych w mojej opinii pozycji. Ale to nie jest wyczerpująca lista, gdyż w tym miejscu chciałbym podkreślić, że pierwsza publikacja z cyklu [1] to publikacja przeglądowa cytująca aż 168 pozycji literaturowych. Nie ma zatem wątpliwości, że Doktorantka dokonała dogłębnego przeglądu literatury i była dzięki temu świetnie przygotowana do badań eksperymentalnych. Zdołała w ten sposób znaleźć obszary, w których nie było do tej pory zbyt wielu prac eksperymentalnych.

### Ocena przedstawionych wyników badań

Cykl publikacji składa się z czterech pozycji. Umieszczam je w logicznej kolejności, którą Doktorantka zastosowała, przedstawiając ich omówienie w rozprawie, a nie według chronologii akceptacji przez edytorów czasopism naukowych. Są to:

- [1] Nowak-Lange Marta, Niedziałkowska Katarzyna, Lisowska Katarzyna (2022) Cosmetic preservatives – hazardous micropollutants in need of greater attention? *International Journal of Molecular Science*. 23: 14495, IF2021 = 6.208; IF5-letni = 6.628; pkt. MEiN = 140.
- [2] Nowak Marta, Zawadzka Katarzyna, Lisowska Katarzyna (2020). Occurrence of methylisothiazolinone in water and soil samples in Poland and its biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Chemosphere*, 254: 126723, doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.126723. IF2020 = 7.086; IF5-letni = 6.956; pkt. MEiN = 140.
- [3] Nowak Marta, Zawadzka Katarzyna, Szemraj Janusz, Góralczyk-Bińkowska Aleksandra, Lisowska Katarzyna (2021). Biodegradation of Chloroxylenol by *Cunninghamella elegans* IM 1785/21GP and *Trametes versicolor* IM 373: Insight into Ecotoxicity and Metabolic Pathways, *International Journal of Molecular Science*, 22(9): 4360, doi: 10.3390/ijms22094360. IF2021 = 6.208; IF5-letni = 6.628; pkt. MEiN = 140.
- [4] Nowak-Lange Marta, Niedziałkowska Katarzyna, Bernat Przemysław, Lisowska Katarzyna (2022). In vitro study of the ecotoxicological risk of methylisothiazolinone and chloroxylenol towards soil bacteria, *Scientific Reports*, 12: 19068, doi: 10.1038/s41598-022-22981-9. IF2021 = 4.997; IF5-letni = 5.516; pkt. MEiN = 140.

Sumaryczny IF tych wszystkich publikacji wynosi 25,728 (liczony z pięcioletnich wskaźników). Wszystkie artykuły zostały opublikowane w czasopismach z IF powyżej 5, a zatem cykl ten jest w mojej opinii zdecydowanie wyróżniający się. Sumaryczna liczba punktów MEiN to 560,

co jest świetnym wynikiem, mimo niedoceniań przez MEiN naprawdę dobrych czasopism, także tych, w których Doktorantka opublikowała artykuły ze swojego cyklu.

Wkład mgr Marty Nowak-Lange w powstanie tych publikacji wynosi od 70 do 80% według oświadczeń współautorów, co oznacza, że odegrała ona kluczową rolę w ich powstaniu. Jest to istotne przy ocenie rozpraw doktorskich składających się z cyklu publikacji i ten udział uważam za wyróżniający się.

Teraz omówię bardziej szczegółowo to, czego mgr Marta Nowak-Lange dokonała, realizując postawione sobie cele badawcze i sposób, w jaki to opisała w poszczególnych artykułach składających się na cykl publikacji przedstawionych jako rozprawa doktorska.

Artykuł [1] to praca przeglądowa. Już wcześniej podkreśliłem to, że Doktorantka, pisząc taką pracę, bardzo dobrze przygotowała się do badań eksperymentalnych. Pokazała, że, pomimo prowadzonych badań nad konserwantami używanymi w *personal care products* (PCP), tak naprawdę nasza wiedza na temat tych związków jest nadal ograniczona, a długa lista niepożądanych oddziaływań tej grupy związków chemicznych z przyrostkiem "-toksyczność" i innych podobnych efektów brzmi groźnie z punktu widzenia użytkowników kosmetyków. Czytając ten artykuł przeglądowy, widać wyraźnie wielką pracę, którą mgr Marta Nowak-Lange włożyła w przegląd literatury przedmiotu. Przedstawienie w tym artykule aż 168 pozycji literaturowych robi bardzo dobre wrażenie, o czym już wspominałem w ocenie piśmiennictwa. Właśnie ten przegląd literatury skłonił mgr Martę Nowak-Lange do wyboru dwóch związków o charakterze biocydów z grupy konserwantów PCP, metyloizotiazolinonu i chloroksylenolu do badań eksperymentalnych.

Tu chciałbym jeszcze wyraźnie podkreślić, że mimo tego, że pierwsza publikacja z cyklu została chronologicznie opublikowana jako ostatnia w żadnej mierze nie jest w mojej opinii słabością tej rozprawy, co chciałbym wyraźnie podkreślić. Cykle publikacyjne bardzo różnie rozkładają się w czasopiśmie naukowych.

Artykuł [2] jest pracą oryginalną opublikowaną w *Chemosphere* dotyczącą usuwania metyloizotiazolinonu oraz jego występowania w środowisku. Od razu podkreślę, że *Chemosphere* jest w mojej opinii jednym z czołowych czasopism publikujących artykuły na temat biodegradacji związków chemicznych, badań toksykologicznych itp. Zanim jednak Doktorantka przystąpiła do badań, wykonała niepublikowany skrining grzybów strzępkowych w kierunku możliwości usuwania metyloizotiazolinonu. Stąd nastąpił wybór grzyba białej zgnilizny drewna *Phanerochaete chrysosporium*, a degradacja metyloizotiazolinonu przez tego grzyba została zaprezentowana w tym artykule. Doktorantka wykazała, że ten grzyb wykazuje wysoką tolerancję na badany ksenobiotyk w szerokim zakresie stężeń (od 50 µg/l do 30 mg/l) oraz skutecznie go eliminuje z brzojki hodowlanej. Ponad 90% ubytek badanego biocydu był obserwowany już po 6 godzinach kontaktu z grzybnią w hodowli wstrząsanej. Metyloizotiazolinon był bardzo szybko i wydajnie usuwany. Co więcej Doktorantka wykazała dzięki analizie chromatograficznej sprzężonej ze spektrometrią mas pojawienie się trzech produktów biotransformacji tego biocydu dwóch hydroksylowanych pochodnych czyli

hydroksymetyloizotiazolinonu i dihydroksymetyloizotiazolinonu oraz kwasu N-metylomalonowego. Ten ostatni powstał po rozerwaniu pierścienia heterocyklicznego metyloizotiazolinonu, a w dwóch pierwszych produktach rozkładu pierścień był zachowany.

Wynik prac eksperymentalnych w mojej opinii nie był zaskoczeniem, gdyż grzyby białej zgnilizny drewna jako te, które odżywiają się tak „ciężkostrawnym” substratem jak drewno mają bogaty arsenał enzymatyczny do degradacji szerokiej gamy związków, w tym ligniny. Należy tutaj pochwalić Doktorantkę za trafny wybór mikroorganizmu degradującego. Co ważne, mgr Marta Nowak-Lange udowodniła zwiększoną aktywność lakazy pod wpływem obecności metyloizotiazolinonu, określając w ten sposób mechanizm usuwania tego ksenobiotyku. Po to żeby badania były kompletne i prowadziły do bardziej szczegółowych wniosków, Doktorantka przeprowadziła analizę toksykologiczną podłoża hodowlanego przed i po eliminacji metyloizotiazolinonu. Wykorzystała testy toksyczności z udziałem *Daphnia magna* jako organizmu wskaźnikowego, a jako miarę toksyczności wykorzystała procent śmiertelności skorupiaków. Przy najwyższych stężeniach metyloizotiazolinonu (30 mg/l) ginęły wszystkie skorupiaki, ale produkty biotransformacji okazały się mniej toksyczne niż metyloizotiazolinon i w brzezce pohodowlanej ta śmiertelność nie przekraczała 20%. Podsumowując tę część omawianego artykułu, chciałbym podkreślić, że Doktorantka przeprowadziła badania kompleksowo. To, że znika biocyd z podłoża to jedno, ale to, w co się przekształca i czy to coś nie jest groźniejsze dla środowiska niż wejściowy związek, to już inna sprawa. Zatem metodologicznie te badania zostały przeprowadzone wzorowo. Artykuł [2] jeszcze zawiera inne dane eksperymentalne, które, mogłoby się wydawać na pierwszy rzut oka, że nie do końca pasują do całości artykułu. Są to dane monitoringowe. Aby lepiej uzasadnić potrzebę wykonywania badań nad biologicznym usuwaniem metyloizotiazolinonu, Doktorantka przeprowadziła analizę obecności tego biocydu w środowisku. Okazało się, że w Polsce i w glebie (Tomaszów Mazowiecki) i w piasku nad Morzem Bałtyckim (to chyba nie zaskakuje, biorąc pod uwagę zużycie kosmetyków plażowych), a także w Grupowej Oczyszczalni Ścieków w Łodzi Doktorantka wykryła metyloizotiazolinon jako mikrozanieczyszczenie. W mojej opinii ten element dodał wartości temu artykułowi, bo nie zawsze się zdarza, że badacze zajmujący się, ogólnie rzecz biorąc, usuwaniem ksenobiotyków wspierają się danymi monitoringowymi. W mojej opinii to jest bardzo dobre podejście do tego typu badań naukowych.

Kolejny etap badań mgr Marty Nowak-Lange to drugi konserwant chloroksylenol i trzeci artykuł z cyklu. Badania zaprezentowane w tym artykule były znów poprzedzone niepublikowanym skринingiem grzybów. W tym przypadku Doktorantka zaproponowała jako mikroorganizmy usuwające chloroksylenol *Trametes versicolor* (kolejny grzyb degradujący drewno) oraz słynny w literaturze przedmiotu destruktor ksenobiotyków *Cunninghamella elegans*.

Doktorantka pokazała, że chloroksylenol nieco hamował wzrost obu grzybów przy stężeniu 50 mg/l. Ten konserwant okazał się bardziej odporny na usuwanie, bo po 24 godzinach tylko 67% chloroksylenolu zniknęło z podłoża hodowlanego zaś po 120 godzinach 70-79% zależnie od użytego

grzyba strzępkowego. Tutaj również Doktorantka pokazała, że usuwanie biocydu przebiegało na drodze biotransformacji w procesach dehalogenacji, hydroksylacji i utleniania prowadzącego do rozszczepienia pierścienia aromatycznego. Wykazała po raz pierwszy obecność trzech produktów biotransformacji chloroksylenolu przez *Trametes versicolor*: kwasu 4,6-dioksoheks-2-enowego, kwasu 5-metylo-6-oksoheksa-2,4-dienowego oraz kwasu 3-chloro-2,4-dimetyloheksa-2,4-dienodiowego. Tu należy podkreślić, że biotransformacja przebiegła znacznie głębiej niż w przypadku zastosowania *C. elegans*, gdyż te trzy związki są niearomatyczne, zatem *T. versicolor* był zdolny do rozerwania pierścienia, co raczej nie udało się *C. elegans*. W przypadku *C. elegans* Doktorantka wykryła trzy aromatyczne związki powstające w wyniku biotransformacji chloroksylenolu. Były to 4-chloro-3,5-dimetylofenol, 2,6-dimetylobenzeno-1,4-diol oraz 2,5-dihydroksy-3-metylbenzaldehyd. Mechanizm usuwania biocydu przez *C. elegans*, był związany z cytochromem P450, o czym świadczyła zwiększona ekspresja genów CYP i CPR w momencie najszybszego rozkładu biocydu w czasie inkubacji. Również obserwowana była zwiększona aktywność lakazy u *T. versicolor* w czasie degradacji chloroksylenolu i to właśnie lakaza była odpowiedzialna za rozkład tego ksenobiotyku przez *T. versicolor*.

W tym artykule mgr Marta Nowak-Lange przedstawiła również badania toksykologiczne. Organizmami wskaźnikowym były skorupiak *Daphnia magna* oraz rośliny *Lepidium sativum* i *Sorghum saccharatum*. I w tym przypadku okazało się, że płyny pochodzące mają niższą toksyczność, a procentowy efekt toksyczności spadał ze 100% do 10-20% po 120 godzinnej inkubacji z grzybami, zarówno dla skorupiaków, jak i roślin.

Podsumowując, w mojej opinii ważnym osiągnięciem w tym artykule jest pokazanie dwóch mechanizmów rozkładu chloroksylenolu, zależnie od grzyba strzępkowego. To wnosi istotną wiedzę w poznanie mechanizmów degradacji tego typu związków

Czwarty artykuł [4] zamyka cykl publikacji i jest wartościową pracą, której celem było pokazanie szkodliwości badanych biocydów na środowisko, a konkretnie na bakterie glebowe. Doktorantka założyła, że tak silnie biobójcze związki nie pozostają w glebie bez wpływu na żyjące w niej mikroorganizmy. Mgr Marta Nowak-Lange wybrała cztery bakterie glebowe *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas moorei*, *Sphingomonas mali* i *Bacillus subtilis* jako organizmy wskaźnikowe. Wybór ten oparła na słusznej przesłance, że akurat te szczepy mają duży wpływ na żyzność gleby.

Najważniejszym osiągnięciem tej części badań było znalezienie zależności pomiędzy inhibicją wzrostu tych bakterii a stężeniem badanych biocydów. Ale jednocześnie przy niższych stężeniach zarówno chloroksylenolu, jak i metyloizotiazolinonu zaobserwowała stymulację wzrostu szczepów *Pseudomonas* i *Bacillus*. Największą oporność wobec biocydów wykazał *Sphingomonas mali*. Dodatkowo Doktorantka zbadała wpływ tych biocydów na tworzenie biofilmu na cząstkach gleby. Ważnym wskaźnikiem toksyczności była zawartość reaktywnych form tlenu (ROS) pod wpływem badanych ksenobiotyków, które się indukowały wraz ze wzrostem stężenia ksenobiotyków. Kolejnym wskaźnikiem żywotności bakterii była produkcja hormonu z grupy auksyn kwasu indolo-3-octowego.

Wreszcie Doktorantka zbadała wpływ biocydów na przepuszczalność błony komórkowej bakterii i jej profilu fosfolipidowego. Ta długa lista wskaźników, które Doktorantka używała jako miary toksyczności czy inhibitowania wzrostu bakterii jest naprawdę imponująca i bardzo dobrze świadczy o wiedzy Doktorantki z obszaru ekotoksykologii. Wykorzystała ona zaawansowane techniki analityczne do oceny toksyczności, co jest niezaprzeczalnym atutem tej pracy. Ostatecznie okazało się, że metyloizotiazolinon jest bardziej toksyczny wobec badanych bakterii niż chloroksylenol. Potwierdziła, że oba badane biocydy stanowią zagrożenia mikroflory glebowej i szerzej całego jej ekosystemu, co jest niestety pesymistycznym wnioskiem wynikającym z tych badań.

Podsumowując tę część recenzji, uważam, że artykuły są oryginalnym monotematycznym cyklem publikacji. Postawione przez Doktorantkę cele zostały w pełni zrealizowane. Jest to znaczące osiągnięcie niniejszej rozprawy doktorskiej, ponieważ do tej pory w literaturze naukowej nie było tak obszernych doniesień na temat procesów usuwania metyloizotiazolinonu i chloroksylenolu przez grzyby strzępkowe. Artykuły są napisane na bardzo wysokim poziomie, tematyka badawcza aktualna. Mgr Marta Nowak-Lange doszła do konkretnych i jasnych wniosków. Dodatkowo jeszcze raz chciałbym zwrócić uwagę na wysoką jakość prowadzonych badań przez Doktorantkę pod względem zastosowanych technik analitycznych. Umiała ona wykorzystać najnowocześniejsze aparaty badawcze i zastosowanie metod eksperymentalnych oceniam bardzo wysoko. Na koniec zwrócę uwagę na staranność obróbki danych eksperymentalnych, a przede wszystkim na statystyczną ocenę uzyskanych wyników. Doktorantka bardzo dobrze sobie poradziła z zawansowaną analizą statystyczną uzyskanych danych eksperymentalnych, co zdecydowanie wpływa pozytywnie na rzetelność prowadzonych badań i wiarygodność uzyskanych wyników. Ta praca jest niewątpliwie bardzo dobrym przykładem wykorzystania pakietu Statistica w naukach biologicznych.

### **Ocena języka rozprawy doktorskiej**

Pod względem językowym rozprawa doktorska jest przygotowana bez zarzutu. Na uwagę zasługuje bardzo dobry naukowy styl pisanie w języku polskim, chociaż Doktorantka nie uniknęła błędów interpunkcyjnych i drobnych błędów stylistycznych, Tłumaczenie streszczenia pracy w języku angielskim jest na dobrym poziomie.

### **Uwagi do rozprawy doktorskiej**

W tej części recenzji przedstawię dwie uwagi dyskusyjne, do których chciałbym, żeby mgr Marta Nowak-Lange odniosła się na obronie.

Po analizie artykułów [2] i [3] przychodzi myśl dotycząca biodegradacji obu badanych biocydów. Czy wykryte produkty biotransformacji metyloizotiazolinonu i chloroksylenolu były obecne w podłożu do końca inkubacji? Jak zmieniała się ich ilość? Czy badane grzyby strzępkowe były w stanie całkowicie zmineralizować dany biocyd? Fakt pojawienia się produktów rozkładu o charakterze niearomatycznym, czy z rozerwanym pierścieniem heterocyklicznym być może wskazuje



na zdolność do pełnej mineralizacji np. chloroksylenolu. Brakuje w tej rozprawie podania zmian sygnałów (pole powierzchni pików) ze spektrometru mas produktów rozkładu przez cały czas trwania procesu i bardziej szczegółowej dyskusji na ten temat. Rys. S3 w artykule [3] pokazuje zmiany sygnałów produktów rozkładu chloroksylenolu w czasie, ale niestety ten rysunek jest niezbyt czytelny. Nasuwa się też pytanie, jak takie zmiany ilości produktów biotransformacji wyglądały w przypadku rozkładu metyloizotiazolinonu.

Forma rozprawy jako cyklu publikacji sprawia, że nieco brakuje porównań. Chciałbym, żeby Doktorantka szerzej przedyskutowała przydatność poszczególnych szczepów do degradacji badanych ksenobiotyków. Szczególnie ciekawe mogłoby być porównanie zdolności grzybów białej zgnilizny drewna i *Cunninghamella elegans*.

Powyższe uwagi mają charakter dyskusyjny i w żadnej mierze nie zmniejszają wysokiej jakości niniejszej rozprawy doktorskiej.

### **Podsumowanie: oryginalność pracy, praktyczne zastosowanie**

Mgr Marta Nowak-Lange przedstawiła niewątpliwie oryginalną rozprawę doktorską na temat usuwania metyloizotiazolinonu i chloroksylenolu przez grzyby strzępkowe. Dowodem na to jest wyjątkowo szczegółowy przegląd literatury i wpasowanie się Doktorantki na jego podstawie w obszar badań (wybór substancji chemicznych i szczepów grzybów strzępkowych), który pozostawał do tej pory *carta blanca* w literaturze przedmiotu. O oryginalności świadczy również to, że Doktorantka znalazła nieliczne, ledwie podobne prace badawcze do dyskusji w swoich artykułach naukowych wchodzących w skład cyklu.

Zagrożenie, jakie stanowią metyloizotiazolinon i chloroksylenol w środowisku, wykazała Doktorantka poprzez badania monitoringowe i toksykologiczne wobec bakterii glebowych, zatem w przyszłości badania nad skutecznym usuwaniem tych biocydów przez grzyby mogą być wykorzystane w praktyce. Jednak należy pamiętać, że typ badań prowadzonych przez mgr Martę Nowak-Lange to badania podstawowe w małej skali laboratoryjnej, skąd jest jednak bardzo długa droga do praktycznych rozwiązań technicznych.

Chciałbym tu jeszcze dodać, że dodatkowy dorobek Doktorantki poza cyklem publikacji jest również bardzo dobry (4 publikacje w czasopiśmie z IF) i 18 komunikatów konferencyjnych. Indeks Hirscha jest równy 4. Mgr Marta Nowak-Lange ma 37 cytowań, co uważam za dobry wynik na tym etapie rozwoju kariery naukowej. Znaczący jest również fakt realizacji tych badań w ramach projektu naukowego we współpracy z Zakładem Biochemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

### **Ocena końcowa**

Podsumowując niniejszą recenzję, bez wątplenia mogę stwierdzić, że mgr Marta Nowak-Lange w swojej rozprawie doktorskiej wykazała się zarówno wiedzą teoretyczną, jak i praktyczną w dyscyplinie nauk biologicznych w obszarze realizowanych badań. Posiadła również umiejętność

samodzielnego prowadzenia badań naukowych, analizy wyników eksperymentalnych oraz ich krytycznej oceny wraz z dyskusją z danymi literaturowymi.

Zatem ostatecznie stwierdzam, że w mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Marty Nowak-Lange spełnia wymogi określone w stosownych przepisach Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, innych towarzyszących aktach prawnych oraz aktach wykonawczych do tejże ustawy. W związku z tym wnioskuję do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie mgr Marty Nowak-Lange do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora nauk ścisłych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Biorąc pod uwagę wysoką jakość niniejszej rozprawy doktorskiej, składam wniosek o jej wyróżnienie. Argumentuję to:

- bardzo wysokim poziomem merytorycznym badań, przejawiającym się ich szerokim zakresem, doborem zaawansowanych technik eksperymentalnych, szczegółową analizą danych eksperymentalnych i dojrzałym sposobem wnioskowania,
- faktem, że są to jedne z nielicznych na świecie badań nad metyloizotiazolinonem i chloroksylenolem w szerokim ujęciu od monitoringu, poprzez biologiczne usuwanie tych związków wraz z mechanizmem tego procesu, aż do oceny toksykologicznej produktów ich rozkładu, co jest w mojej opinii znaczącym walorem poznawczym pracy,
- formą przedstawionej rozprawy doktorskiej w postaci 4 publikacji w bardzo dobrych czasopismach z *Impact Factor* i wysoką punktacją MEiN.

Włodzisław Białko