

Katowice, 24.02.2022

Prof. dr hab. Grażyna A. Płaza
Instytut Ekologii Terenów
Uprzemysłowionych
Katowice

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pana mgr Tomasza Janickiego

pt.: „Eliminacja i detoksykacja wybranych związków fenolowych oraz jonów metali ciężkich z wykorzystaniem grzyba strzępkowego *Umbelopsis isabellina*”

Przesłanki formalno-prawne przygotowania oceny pracy doktorskiej

Podstawą wykonania oceny pracy doktorskiej Pana mgr Tomasza Janickiego było pismo Przewodniczącej Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne Pani prof. dr hab. Agnieszki Marczak z dnia 25 stycznia 2022 r. informujące o powołaniu mnie na recenzenta ww pracy zgodnie z decyzją Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne podjętą na posiedzeniu w dniu 25 stycznia 2022 r.

Pan mgr Tomasz Janicki przedstawił rozprawę doktorską zatytułowaną „**Eliminacja i detoksykacja wybranych związków fenolowych oraz jonów metali ciężkich z wykorzystaniem grzyba strzępkowego *Umbelopsis isabellina*”** wykonaną pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Jerzego Długońskiego, wykonanej w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii Instytutu Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii Uniwersytetu Łódzkiego, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska. Promotorem pomocniczym w pracy był Pan dr Mariusz Krupiński.

Źródła finansowania pracy doktorskiej

Pracę wykonano w ramach dwóch grantów finansowanych przez NCN, jeden otrzymany w konkursie Opus 1 pt.: „Mikrobiologiczna degradacja ksenoestrogenów i estrogenów w obecności metali ciężkich oraz NaCl” (kierownik projektu: prof. dr hab. Jerzy Długoński), drugi z konkursu Sonata pt.: „Mikrobiologiczna degradacja wybranych ksenobiotyków o właściwościach endokrynych obecnych w produktach codziennego użytku i chemii gospodarczej” (kierownik projektu: dr Mariusz Krupiński).

Badania również finansowano z dotacji celowej MNiE na działalność związaną z prowadzeniem badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich w latach 2014-2016.

1. Ocena problematyki badawczej rozprawy

Obecnie przedmiotem zainteresowania wielu naukowców są mikrozanieczyszczenia organiczne o właściwościach estrogennych pochodzenia naturalnego, takie jak hormony roślinne (fitoestrogeny) oraz związki chemiczne wytwarzane przez człowieka i wprowadzane do naszego środowiska, wśród których wymienia się alkilofenole, chlorofenole i bisfenol A. Związki chemiczne te nazwano ogólnie ksenoestrogenami ze względu na to, że wykazują zdolność interakcji z układem hormonalnym i modulowania jego czynności w sposób charakterystyczny dla żeńskich hormonów płciowych – estrogenów. Ksenoestrogeny zalicza się do szerokiej grupy nazywanej w piśmiennictwie angielskim „*endocrine disrupting compounds*” (EDCs), natomiast w polskim piśmiennictwie stosuje się sformułowanie „modulatory hormonalne”, co nie do końca oddaje charakter tych związków, które raczej zaburzają niż modulują gospodarkę hormonalną organizmu. Ksenoestrogeny nie mają jednolitej struktury chemicznej. Do tej grupy zalicza się zarówno związki alifatyczne, jak i aromatyczne; niektóre z nich zawierają metale ciężkie i fluorowce. Przynależność poszczególnych związków do ksenoestrogenów determinowana jest nie tylko przez ich strukturę chemiczną, ale przez sposób działania na organizmy żywe. Taka sytuacja znacznie utrudnia rozpoznanie tych związków, gdyż dopiero testy biologiczne *in vitro* i *in vivo* wykazują, czy dany związek ma właściwości estrogenne. Intensywny rozwój przemysłu chemicznego (niektóre herbicydy i pestycydy) i upowszechnianie leków opartych o estrogeny skutkuje uwalnianiem do środowiska znacznych ilości tych substancji, które zaburzają funkcjonowanie organizmu i równowagę hormonalną.

Obecnie, ksenoestrogeny znajdują się w centrum uwagi, ze względu na ich szerokie zastosowanie w rolnictwie, gospodarstwie domowym i przemyśle wykorzystywane są jako plastiki, detergenty, surfaktanty, środki emulgujące i konserwujące, itp., negatywne oddziaływanie na organizmy żywe, skomplikowaną strukturę chemiczną oraz trudności i brak wiedzy i doświadczenia w opracowywaniu technik detekcji oraz usuwania ich ze środowiska naturalnego.

Powyższą problematyką zajmuje się prezentowana praca doktorska Pana mgr Tomasza Janickiego. Badania podjęte w recenzowanej pracy są kontynuacją wieloletnich badań prowadzonych w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii UŁ pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Jerzego Długońskiego, a dotyczące, w ogólnym pojęciu - biologicznej degradacji (biodegradacji) wybranych ksenobiotyków przez grzyby i bakterie. Doktorant w pracy wykazał, że szczep grzyba strzępkowego *Umbelopsis isabellina* może być wykorzystany w usuwaniu zarówno wybranych związków fenolowych, jak i jonów metali ciężkich. Biologiczna degradacja związków fenolowych (4-nonylofenolu, 4-kumylofenolu i 4-*tert*-oktyfenolu) przez mikroorganizmy jest najmniej poznanym sposobem usuwania ksenobiotyków ze środowiska. Procesy mikrobiologicznego rozkładu ksenoestrogenów nie zostały w pełni poznane, a to ze względu na ich skomplikowaną strukturę chemiczną, zakres i szybkość przemian biodegradacyjnych, dostępność ksenobiotyków w środowisku, możliwości rozkładu tych związków przez mikroorganizmy, precyzję i dokładność metod ich detekcji.

Podjęte badania umożliwiły pozyskanie nowej wiedzy naukowej na temat właściwości biochemicznych grzyba strzępkowego *Umbelopsis isabellina* i jego specyficznych cech: biosorpcji metali i biodegradacji, gwarantujących jego udział w procesach usuwania zarówno związków organicznych, jak i jonów metali ciężkich. Biorąc pod uwagę aktualny stan wiedzy, uzasadnione jest prowadzenie badań poszukiwania skutecznych i wydajnych metod eliminacji ksenobiotyków, poznanie mechanizmów ich rozkładu poprzez opracowanie szlaków biodegradacyjnych, czy też właściwości sorpcyjnych oraz szacowanie właściwości toksycznych estrogennych/androgennych produktów zachodzących przemian.

Poznanie właściwości biodegradacyjnych badanego grzyba pozwala na jego zastosowanie jako „bioszczepionka” w oczyszczaniu środowisk zanieczyszczonych tymi ksenobiotykami lub w zwiększeniu efektywności prowadzonych procesów. Jako potwierdzenie biotechnologicznego zastosowania badanego szczepu, Doktorant przedstawił wyniki badań dotyczące usuwania lotnych związków fenolowych z odcieków pochodzących z składowiska odpadów przemysłowych.

Doktorantowi, po raz pierwszy, udało się ocenić możliwości szczepu do synergistycznego eliminacji związków fenolowych oraz wybranych jonów metali ciężkich w badanych układach doświadczalnych.

Biorąc pod uwagę powyższe względy, a także aktualne trendy w mikrobiologii środowiskowej, uważam podjęcie, przez Pana mgr Tomasza Janickiego badań ukierunkowanych na przedstawioną problematykę, za celowe i w pełni uzasadnione.

Tematyka podjętych badań jest aktualna, i pomimo wielu doniesień dotyczących mechanizmów przemian związków ksenobiotycznych i roli mikroorganizmów w tych procesach, to jednakże wiedza w tym zakresie jest ograniczona.

2. Formalna ocena rozprawy

W skład przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej wchodzi spójny tematycznie zbiór trzech publikacji:

Prace opublikowane:

- P1 – **Janicki T.**, Krupiński M., Długoński J. (2016) Degradation and toxicity reduction of the endocrine disruptors nonylphenol, 4-*tert*-octylphenol and 4-cumylphenol by the non-ligninolytic fungus *Umbelopsis isabellina*. *Bioresource Technology*, 200, 223-229. (IF: 9,642; punkty MNiE: 140; liczba cytowań: 34)
- P2 – **Janicki T.**, Długoński J., Krupiński M (2018) Detoxification and simultaneous removal of phenolic xenobiotics and heavy metals with endocrine-disrupting activity by the non-ligninolytic fungus *Umbelopsis isabellina*. *Journal of Hazardous Materials* 360, 661-669. (IF: 10,588; punkty MNiE: 200; liczba cytowań: 14)

Prace wysłane do redakcji czasopism:

- P3 – **Janicki T.**, Długoński A., Felczak A., Długoński J., Krupiński M. (2021) Ecotoxicological estimated of 4-cumylphenol, 4-*t*-octylphenol, nonylphenol and volatile leachate phenol degradation by the microscopic fungus *Umbelopsis isabellina* using a battery of biotests. *Chemosphere* (artykuł w recenzji) (IF: 7,086; punkty MNiE: 140)

Sumaryczny IF dla publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi 27,316, natomiast sumaryczna liczba punktów MEiN to 480 punktów. Ogólna liczba cytowań publikacji to 43 (Web of Science, 23.02.2022). Wszystkie publikacje są w wykazie publikacji MNiE. Doktorant we wszystkich publikacjach jest pierwszym autorem, Z przedstawionych oświadczeń Doktoranta i współautorów wynika, iż Jego rola w przygotowaniu tych prac była wiodąca. Ponadto, z przedstawionych oświadczeń określających indywidualny wkład Doktoranta wynika, że miał On wiodący udział w opracowaniu koncepcji każdej z prac, wykonaniu doświadczeń, analizie wyników oraz w opracowaniu wszystkich manuskryptów i ich edycji. Średni procentowy udział Doktoranta w przygotowaniu i opracowaniu wyżej wymienionych publikacji, wynosił ponad 50 %.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej objęto wspólnym tytułem „*Eliminacja i detoksykacja wybranych związków fenolowych oraz jonów metali ciężkich z wykorzystaniem grzyba strzępkowego *Umbelopsis isabellina**”, a pracy, złożonej z IX rozdziałów, nadano strukturę obejmującą: wprowadzenie (I), cele pracy (II), techniki wykorzystywane w pracy (III), prezentacja wyników będących podstawą cyklu publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (IV), podsumowanie oraz wnioski końcowe (V), streszczenie w języku polskim i angielskim (VI i VII), wykaz dorobku naukowego Doktoranta (pozostałe publikacje, udział w konferencjach naukowych, kursy, szkolenia) (VIII), literatura (IX) oraz załączniki stanowiące publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej wraz z oświadczeniami Doktoranta i współautorów prac (VIII), streszczenie w języku angielskim i polskim (IX i X), literatura (XI). Praca w takim układzie liczy 110 stron.

Tytuł ocenianej pracy doktorskiej jest precyzyjny i w pełni odpowiada jej treści, którą stanowi cykl powiązanych tematycznie, wymienionych wyżej, trzech publikacji naukowych. Rozprawa doktorska jest, w mojej ocenie, kompletna, a jej układ oceniam jako prawidłowy.

3. Merytoryczna ocena pracy

Praca koncentruje się na następujących aspektach naukowych:

- badanie stopnia degradacji ksenobiotyków fenolowych o właściwościach endokrynych: 4-nonylofenolu, 4-*tert*-oktylofenolu i 4-kumylofenolu przez szczep *Umbelopsis isabellina* w układach pojedynczych i razem z jonami metali ciężkich (współwystępowanie), w warunkach tlenowych;
- badanie toksyczności i ekotoksyczności produktów rozkładu tych związków wykorzystując różne biotesty – analiza i ocena ryzyka środowiskowego;
- badanie potencjału bioremediacyjnego szczepu *Umbelopsis isabellina* na przykładzie odcieku pochodzącego ze składowiska odpadów niebezpiecznych.

W pracy Autor zaprezentował badania podstawowe o charakterze interdyscyplinarnym z zakresu mikrobiologii, biologii eksperymentalnej, biotechnologii, ekotoksykologii oraz chemii. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Autor w swoich badaniach wykorzystał wiedzę i warsztat badawczy z różnych dziedzin. Zastosowanie przez Doktoranta różnych metod badawczych i modeli doświadczalnych świadczy o szerokim Jego spojrzeniu na prezentowane w pracy zagadnienia i ich wielowątkowości, co należy docenić w pracy naukowej. Innym

aspektem, na który należy również zwrócić szczególną uwagę jest zastosowanie dokładnej analizy chemicznej, oraz ekotoksykologicznej produktów pośrednich powstałych podczas rozkładu ksenobiotyków.

Omówienie dotychczasowego stanu wiedzy w temacie rozprawy, zebrane we wprowadzeniu, jest ciekawe, wyczerpujące i wnikliwe, oparte na literaturze z ostatnich lat. Wnikliwa analiza literatury pozwoliła Doktorantowi na znalezienie obszarów naukowych niezbadanych w danym temacie.

Cele badań zostały sformułowane w sposób precyzyjny i logiczny. W części metodologicznej przedstawiono techniki wykorzystywane podczas realizacji pracy doktorskiej wraz ze wskazaniem do jakich badań zostały użyte.

W następnych rozdziałach Doktorant opisał, w sposób syntetyczny, wyniki badań uzyskane i szczegółowo przedstawione w poszczególnych publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Opis wyników jest przedstawiony w sposób logiczny i stanowi bardzo dobre wprowadzenie do kolejnych rozdziałów, nakreślając jednocześnie spójność poszczególnych prac wchodzących w skład rozprawy. Tak zaplanowane badania umożliwiły Doktorantowi uzyskanie odpowiednich wyników oraz ich opublikowanie w wysokopunktowanych czasopismach z listy MNiE.

Ilość i jakość zaplanowanych i przeprowadzonych badań w pracy świadczy o opanowaniu przez Doktoranta w stopniu bardzo dobrym warsztatu pracy doświadczalnej oraz umiejętności samodzielnego myślenia.

Uzyskane przez Doktoranta rezultaty stanowią cenny wkład w badania nad poznaniem procesów degradacyjnych ksenobiotyków fenolowych i metali ciężkich o właściwościach endokrynych.

Dokonując oceny pracy doktorskiej przedstawionej w formie cyklu publikacji stwierdzam, że teść pracy odpowiada jej tytułowi i sformułowanym na początku pracy celom. Analiza otrzymanych w trakcie badań wyników pozwoliła na wysunięcie odpowiednich wniosków istotnych dla dalszych badań. Ilość i jakość zaplanowanych i przeprowadzonych w pracy eksperymentów, świadczy o opanowaniu przez Doktoranta w stopniu bardzo dobrym warsztatu pracy doświadczalnej oraz umiejętności samodzielnego myślenia i samodzielnego prowadzenia pracy badawczej w oparciu o zdobytą wiedzę teoretyczną i specjalistyczną. Doktorant udowodnił, że potrafi przedstawić wyniki własnych badań w oparciu

o dotychczasową wiedzę i co niezmiernie ważne, krytycznie zweryfikować otrzymane wyniki. Świadczy to o Jego dojrzałości jako badacza.

Przeprowadzone prace badawcze zostały już wcześniej pozytywnie ocenione przez redakcje czasopism i niezależnych recenzentów, co potwierdza, że podjęte badania były uzasadnione, prawidłowo zaplanowane oraz właściwie zrealizowane, a praca jako całość stanowi oryginalne rozwiązanie zagadnienia naukowego.

Uwagi do rozprawy doktorskiej

Jak już kilka razy wspominałam rozprawę doktorską Pan mgr Tomasza Janickiego oceniam bardzo wysoko. Jednakże mam kilka pytań do Doktoranta o charakterze dyskusyjnym i proszę, żeby Doktorant odniósł się do nich na publicznej obronie.

Czy na podstawie otrzymanych wyników i danych literaturowych dotyczących produktów pośrednich rozkładu ksenobiotyków fenolowych o właściwościach endokrynnych można określić wstępnie drogi rozkładu tych związków w warunkach tlenowych ?

Dlaczego wybrano do badań 4-nonylofenol, 4-*tert*-oktylofenol i 4-kumylofenol ?

Uwagi do publikacji nr 1:

- 1) proszę omówić dokładnie układ eksperymentalny – czy układ hodowlany stanowił mieszaninę tych związków czy proces degradacji badany był oddzielnie dla każdego związku ?
- 2) co oznacza tNP ? t - jak „technical nonylphenol” lub „total nonylphenol” ? – wytłumaczone w publikacji nr 2
- 3) uwaga (lub wyjaśnienie) do rysunku 2 (publikacja) – wymieniono 5 grup izomerów, proszę o ich dokładniejszą charakterystykę ? (rysunek 1 – materiał uzupełniający)

Uwagi do publikacji nr 2:

- 1) proszę (tak jak w przypadku publikacji nr 1) omówić układ eksperymentalny – w jakich kombinacjach doświadczenie było prowadzone ?; wyniki wskazują na stosowanie różnych układów eksperymentalnych
- 2) proszę omówić sposób obliczania biosorpcji i bioakumulacji metali (Tabela 3).

- 3) proszę podać sposób obliczania i jednostkę detoksykacji układów eksperymentalnych (ang. detoxification) (Tabela 5 i 6)

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny dysertacja doktorska spełnia ustawowe kryteria (art.13, ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, Dz.U. z 2003 r., nr 65, poz. 595, z późn. zm. tj.: stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje szeroką teoretyczną wiedzę Doktoranta i potwierdza umiejętność Doktoranta w zakresie samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Równocześnie, liczba publikacji składająca się na dysertację doktorską, udział procentowy Doktoranta w przygotowaniu i opracowaniu poszczególnych publikacji, wysoki poziom czasopism naukowych, w których Doktorant publikuje, trafny wybór tematyki badań oraz warsztat badawczy w pełni odpowiadają warunkom stawianym dysertacjom doktorskim.

Reasumując, stwierdzam, że recenzowana praca doktorska Pana mgr Tomasza Janickiego pt.: *„Eliminacja i detoksykacja wybranych związków fenolowych oraz jonów metali ciężkich z wykorzystaniem grzyba strzępkowego *Umbelopsis isabellina*”* spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim przedstawione w ww ustawie, i na tej podstawie zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr Tomasza Janickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wniosek o wyróżnienie

Z całym przekonaniem składam wniosek rekomendujący Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne podjęcie uchwały o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej Pana mgr Tomasza Janickiego, biorąc pod uwagę: (i) nowatorski charakter badań, (ii) bardzo wysoką jakość i interdyscyplinarność prowadzonych badań oraz (ii) walory poznawcze i aplikacyjne przedstawionej pracy.

Wyniki pracy zostały opublikowane w czasopismach z listy JCR posiadających od 140 do 200 punktów MNiE, a Doktorant jest pierwszym autorem we wszystkich publikacjach, z udziałem ponad 50 %.