

Prof. dr hab. Katarzyna Hrynkiewicz  
Katedra Mikrobiologii, Instytut Biologii  
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
Lwowska 1, 87-100 Toruń  
Tel. +48 (56) 611-25-40  
E-mail: [hrynk@umk.pl](mailto:hrynk@umk.pl)

Toruń 11.02.2023

#### **Podstawa formalna opinii**

Opinia została sporządzona dla Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne zgodnie z decyzją podjętą na posiedzeniu w dniu 13 grudnia 2022 r.

#### **RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**mgr Aleksandry Góralczyk-Bińkowskiej**

**p.t. „Wykorzystanie grzyba *Nectriella pironii* do produkcji lakazopodobnej oksydazy wielomiedziowej i eliminacji toksycznych zanieczyszczeń przemysłu tekstylnego”**

w postępowaniu dotyczącym nadania stopnia naukowego doktora  
w dyscyplinie nauki biologiczne

Recenzja została przygotowana w oparciu o wymogi określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) oraz stanowisko recenzenta w sprawie dopuszczenia mgr Aleksandry Góralczyk-Bińkowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

## 1. Opis ogólny

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Aleksandry Góralczyk-Bińkowskiej została napisana pod kierunkiem prof. dr hab. Jerzego Długońskiego (promotor) oraz dr Anny Jasińskiej (promotor pomocniczy) w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

Badania naukowe zaprezentowane w rozprawie doktorskiej zostały sfinansowane z funduszy projektu Preludium 14 pt. „Charakterystyka indukcji lakazy grzyba *Myrothecium sp. IM 6443* oraz analiza jej potencjału biodegradacyjnego” przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki (2017-2022; UMO-2017/27/N/NZ9/02160, kierownik projektu: A. Góralczyk-Bińkowska) oraz 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 (rok realizacji 2018; kod projektu: 5811/E-345/M/2018; kierownik projektu: A. Góralczyk-Bińkowska).

Struktura pracy jest zgodna z ogólnymi zasadami i wymogami stawianymi rozprawom doktorskim i składa się z czterech spójnych tematycznie prac naukowych opublikowanych w renomowanych i wysoko punktowanych czasopismach naukowych, które ukazały się w latach 2019-2022: **(P-1)** *Advancements of Microbiology*, 58, 1, 7–18 (IF<sub>2020</sub> = 0.263; MEiN = 20) [<https://doi.org/10.21307/PM-2019.58.1.007>]; **(P-2)** *PLoS ONE*, 15, 4, e0231453 (IF<sub>2021</sub> = 3.240; MEiN = 100) [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231453>]; **(P-3)** *Scientific Reports*, 11, 23829. (IF<sub>2021</sub> = 4.997; MEiN = 140) [<https://doi.org/10.1038/s41598-021-03446-x> ]; **(P-4)** *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19, 13997 (IF<sub>2021</sub> = 4.614; MEiN = 140) IF:; MNiSW: [<https://doi.org/10.3390/ijerph192113997>]. Sumaryczny IF powyższych prac wynosi 13.114, natomiast łączna liczba punktów MEiN 400. We wszystkich tych publikacjach Pani mgr A. Góralczyk-Bińkowska jest pierwszym autorem, co wskazuje na jej wiodącą rolę w planowaniu i realizacji doświadczeń, analizie danych oraz przygotowaniu podstawowej wersji manuskryptów. Potwierdzają ten fakt oświadczenia dołączone do pracy doktorskiej, w których uszczegółowiono zakres prac wykonanych przez Doktorantkę oraz wskazano procentowy udział: 60-70%.

W rozprawie, poza wymienionymi powyżej pracami naukowymi, Doktorantka zamieściła dodatkowo takie rozdziały jak: Wprowadzenie, Cele pracy, Realizacja poszczególnych celów pracy, Wnioski i stwierdzenia końcowe, Streszczenia w języku polskim i angielskim oraz spis literatury. W rozprawie umieszczono również informacje dotyczące finansowania badań oraz całkowitego dorobku naukowego, co pozwala ocenić ogólny rozwój i ukierunkowanie badań naukowych Doktorantki, jak również oświadczenia współautorów.

Głównym celem pracy doktorskiej było ustalenie możliwości wykorzystania mikroskopowego grzyba strzępkowego *Nectriella pironii* IM 6443 do produkcji lakazopodobnej oksydazy wielomiedziowej oraz eliminacji zanieczyszczeń pochodzących z przemysłu tekstylnego takich jak barwniki przemysłowe, aminy aromatyczne oraz wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. Szczegółowe cele pracy zostały przez Doktorantkę przedstawione w formie trzech punktów (str. 9), które pozwoliły określić szczegółowy zakres badań naukowych podjętych w rozprawie.

Wstęp do wyników badań stanowi praca przeglądowa opisująca wielomiedziowe oksydazy (MCO, ang. *multicopper oxidases*), ich podział, mechanizmy warunkujące utlenianie aromatycznych i niearomatycznych związków oraz ich potencjał w wielu gałęziach przemysłu oraz w ochronie środowiska. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań opisane zostały

szczegółowo i przedyskutowane w 3 publikacjach naukowych, prezentujących wyniki prac doświadczalnych.

## 2. Znaczenie i aktualność zagadnień zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej

Wydawać by się mogło, że praca doktorska Pani A. Góralczyk-Bińkowskiej ma charakter lokalny, związany z przemysłem tekstylnym województwa łódzkiego. Sugerować to może np. wykorzystana w badaniach przesiewowych kolekcja szczepów wyizolowana ze skażonej gleby pobranej z terenu dawnych Zakładów Przemysłu Barwników „Boruta” w Zgierzu, badanie i zastosowanie w doświadczeniach odcieków pobranych ze składowiska odpadów niebezpiecznych w okolicach tych nieczynnych już Zakładów. Zważywszy na fakt, że składowisko to uznawane jest za jedną z największych tzw. „bomb ekologicznych” w Polsce, można śmiało stwierdzić, że podjęte przez Doktorantkę badania są niezwykle ważne i bardzo cenne dla tego konkretnego miejsca, a w przyszłości mogą być podstawą do opracowania nowych technologii, wspomagających oczyszczanie tego zanieczyszczonego stanowiska. Należy jednak podkreślić, że produkowane w tych Zakładach i gromadzone na składowiskach substancje barwiące, które przyczyniły się do powstania tego zagrożenia w regionie łódzkim, są powszechnie wykorzystywane na całym świecie i to w wielu gałęziach przemysłu, np. farbiarskim, włókienniczym, kosmetycznym i papierniczym. Z tego też powodu, śmiało można stwierdzić, że uzyskane przez Doktorantkę i opublikowane w pracach naukowych wyniki mają potencjał globalny. W ostatnich latach coraz częściej dowiadujemy się o znajdujących się pod wieloma szerokościami geograficznymi tykających „bomb ekologicznych”. Doktorantka wskazuje na stanowiska o podobnym zagrożeniu znajdujące się w Polsce w swojej publikacji [Rys. 1: Góralczyk-Bińkowska i in. (2022) [Int. J. Environ. Res. Public Health 2022, 19, 13997]. Mając na uwadze ogromne zagrożenie dla środowiska i człowieka konsekwencje związane z występowaniem tego typu stanowisk, podejmowanie działań umożliwiających zmniejszenie tego niekorzystnego wpływu jest w chwili obecnej kluczowym wyzwaniem dla naukowców.

Dostępne dane wskazują, że aż 50% substancji stosowanych w różnych gałęziach przemysłu podczas barwienia może przedostawać się do środowiska w wyniku nieskutecznych procesów technologicznych. Biologiczna eliminacja tych zanieczyszczeń stanowi w tym aspekcie bardzo obiecujące, tanie i przyjazne dla środowiska rozwiązanie eliminacji tego typu zanieczyszczeń. Wykorzystanie do tego celu mikroorganizmów pochodzących z terenów zanieczyszczonych zwiększa szansę na wyselekcjonowanie mikroorganizmów zdolnych do przetrwania w tak zanieczyszczonym środowisku. Doktorantka w ramach realizowanej pracy doktorskiej wyselekcjonowała izolat grzyba strzępkowego *N. pironii*, który posiada potencjalne możliwości wykorzystania w procesach eliminacji różnorodnych zanieczyszczeń takich jak barwniki azowe, aminy aromatyczne czy WWA. Należy podkreślić, że drobnoustrój ten zdolny jest do przekształceń wyżej wymienionych związków nawet w obecności wielu toksycznych substancji. Stąd też można przypuszczać, że możliwe będzie jego zastosowanie również na wielu innych stanowiskach o takim samym lub zbliżonym charakterze zanieczyszczeń.

Przeprowadzone przez Doktorantkę szeroko zakrojone eksperymenty oraz uzyskane wyniki w istotnym stopniu poszerzają wiedzę naukową w temacie wykorzystania grzybów strzępkowych do degradacji toksycznych związków, a w przyszłości mogą w znaczącym stopniu wpłynąć na opracowanie nowatorskich technologii związanych z bioremediacją stanowisk zanieczyszczonych.

### 3. Najważniejsze wyniki pracy doktorskiej przedstawione w publikacjach naukowych i ich znaczenie

Do najważniejszych osiągnięć zaprezentowanych w pracy doktorskiej Pani mgr A. Góralczyk-Bińkowskiej zaliczam:

- I. Opracowanie nowatorskiej technologii umożliwiającej wykorzystanie bioodpadów, takich jak ekstrakt z opadłych liści, do hodowli grzybów i wydajnej produkcji lakazy. Rozwiązanie to może przyczynić się do podejmowania nowych i tańszych rozwiązań w gospodarce odpadami przemysłowymi;
- II. Opracowanie metody oczyszczania mieszaniny zewnątrzkomórkowych białek *N. pironii*, obejmującej wytrącanie białek siarczanem amonu, ultrafiltrację, a następnie chromatografię jonowymienną i filtrację żelową. Opracowanie tej techniki umożliwi jej wykorzystanie przez pracowników lub doktorantów w innych planowanych doświadczeniach;
- III. Potwierdzenie ogromnego potencjału lakazy *N. pironii* i jej przydatności do dekoloryzacji barwników przemysłu tekstylnego zaliczanych do różnorodnych grup chemicznych, takich jak np. barwniki azowe, indygooidowe i antrachinonowe. Wyselekcjonowanie szczepu grzybowego o tak dużych możliwościach daje nadzieję na jego szybkie i skuteczne zastosowanie w praktyce.
- IV. Wykazanie, że grzyb *N. pironii* hodowany w obecności 10% odcieków składowiskowych wykazuje dwukrotnie wyższy przyrost biomasy, natomiast obecna w odciekach *o*-tolidyna (amina aromatyczna powstała na skutek degradacji barwników azowych) jest przekształcana głównie do mniej toksycznej 3,3'-dihydroksybenzydyny (*m/z* 217). Jest to pierwsze doniesienie literaturowe o biotransformacji *o*-tolidyny przez mikroskopowe grzyby. Badania te stanowią cenny wkład w rozwój badań nad eliminacją amin aromatycznych, która do tej pory była szeroko opisywana tylko u bakterii. Uzyskane wyniki mogą być w przyszłości bardzo przydatne w opracowaniu systemu do bioremediacji środowisk skażonych różnorodnymi zanieczyszczeniami.
- V. Potwierdzenie możliwości eliminacji WWA (wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych) przez *N. pironii* w obecności odcieków składowiskowych. Zaprezentowane w pracy doktorskiej badania mają charakter podstawowy, jednakże wskazują na możliwość wykorzystania grzyba *N. pironii* w procesach biodegradacji różnorodnych zanieczyszczeń generowanych przez przemysł tekstylny.

Zamieszczony w pracy doktorskiej Wstęp został napisany w sposób interesujący i wskazujący na najważniejsze problemy, które skłoniły Doktorantkę do podjęcia się badań w tym temacie. Podsumowanie najważniejszych wyników odnosi się do publikacji, które stanowią część pracy doktorskiej i w sposób bardzo rzeczowy uwzględnia i opisuje najcenniejsze dla rozwoju dalszych badań wyniki. Liczba, znaczenie i aktualność wykorzystanych w pracy doktorskiej referencji (ok. 50 pozycji) oraz sposób pisania potwierdzają praktyczną i teoretyczną wiedzę Doktorantki na temat przedstawianego w rozprawie problemu. Większość zacytowanych przez Doktorantkę prac została opublikowana w ostatnich dziesięciu latach w uznanych specjalistycznych czasopismach naukowych.

#### 4. Ogólny dorobek naukowy Doktorantki

Poza publikacjami stanowiącymi część rozprawy doktorskiej, Doktorantka była współautorką siedmiu innych prac naukowych opublikowanych w latach 2016-2022 w renomowanych i wysoko punktowanych czasopismach. Podsumowanie dokonane w pracy doktorskiej wskazuje, że ogólny dorobek naukowy Doktorantki na dzień złożenia pracy wynosi:  $IF_2 = 36,665$ ,  $h = 6$ ,  $MEiN = 900$ , przy liczbie cytowań 62. Pani mgr A. Góralczyk-Bińkowska była również współautorką: 13 rozdziałów w podręcznikach akademickich, 13 doniesień konferencyjnych o zasięgu międzynarodowym i 16 o zasięgu krajowym. Uczestniczyła w organizacji 3 konferencji naukowych, była współorganizatorką warsztatów popularyzujących naukę. Na szczególne uznanie zasługuje staż w ramach programu Erasmus+ w Laboratorium Biochemii Uniwersytetu w Wageningen (Królestwo Niderlandów) [2 miesiące; 2017 r.] Ogromny zakres prac badawczych opisanych w rozprawie oraz udział Doktorantki w dodatkowych aktywnościach wskazuje na jej ogromne zaangażowanie w podejmowaniu nowych wyzwań naukowych.

#### 5. Podsumowanie

Podsumowując, praca doktorska mgr A. Góralczyk-Bińkowskiej stanowi zbiór oryginalnych prac przedstawiających niezwykle ważny i aktualny problem naukowy związany z wykorzystaniem mikroskopowego grzyba strzępkowego *Nectriella pironii* do produkcji lakazopodobnej oksydazy wielomiedziowej oraz eliminacji zanieczyszczeń pochodzących z przemysłu tekstylnego takich jak barwniki przemysłowe, aminy aromatyczne oraz wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. Zaplanowane w trakcie realizacji projektu doktorskiego doświadczenia przeprowadzono przy użyciu zróżnicowanych technik, które pozwoliły na uzyskanie niezwykle cennych wyników badań, które zostały bardzo dokładnie przeanalizowane i omówione w publikacjach naukowych stanowiących część pracy doktorskiej. Rozprawa doktorska została poprawnie przygotowana pod względem redakcyjnym.

#### 6. Uwagi i pytania

- (i) W publikacji Góralczyk-Bińkowska i in. (2020) [PLoS ONE 15(4): e0231453] opisano wyniki identyfikacji wyselekcjonowanego w badaniach izolatu grzybowego charakteryzującego się najwyższym potencjałem do syntezy lakkazy, wskazując, że identyfikacji dokonano w oparciu o analizę sekwencji. Bardzo proszę aby doktorantka wyjaśniła czy wykorzystana do wyszukiwania w bazie danych NCBI BLAST sekwencja została wygenerowana na podstawie nakładających się na siebie fragmentów sekwencji uzyskanych z sekwencjonowania czy pojedynczej sekwencji? Dlaczego w publikacji nie podano długości otrzymanej sekwencji? Dlaczego otrzymana sekwencja nie posiada numeru akcesyjnego nadanego przez NCBI?
- (ii) W publikacji Góralczyk-Bińkowska i in. (2020) [PLoS ONE 15(4): e0231453] przedstawiono Rysunek 3 i 4 (Laccase production by *Nectriella pironii* IM 6443) bez przeprowadzonej analizy statystycznej.

- (iii) W publikacji Góralczyk-Bińkowska i in. (2021) [Scientific Reports, 11, 23829] na Rysunku 3 a i b zastosowano na osi y różne zakresy wartości, co może nieco utrudniać wizualną interpretację danych. Co do zasady, zakresy wartości na osi y powinny wskazywać te same wartości maksymalne.
- (iv) W publikacji Góralczyk-Bińkowska i in. (2022) [Int. J. Environ. Res. Public Health 2022, 19, 13997] autorka w części „2.2. *Microorganism and Growth Conditions*” powołuje się na swoje wcześniejsze publikacje (40 i 41 wg numeracji podanej w publikacji) odnosząc się do informacji na temat stanowiska, z którego został wyizolowany grzyb. Tymczasem w pracach tych nie opisano procedury, czasu i miejsca izolacji.

## 1. Wnioski

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Aleksandry Góralczyk-Bińkowskiej przedstawia szeroko zakrojone i doskonale zaprezentowane wyniki badań, co wpływa na jej ogólny bardzo wysoki poziom merytoryczny. Liczba moich uwag jest niewielka i nie wpływa na ogólną **bardzo dobrą** ocenę pracy. Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa spełnia warunki określone w Ustawie 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.). Wnioskuje do Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Aleksandry Góralczyk-Bińkowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie jej stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Jednocześnie, zwracam się do Członków Komisji o **wyróżnienie pracy doktorskiej** za wyróżniający się poziom merytoryczny pracy doktorskiej i szczególne walory poznawcze, które dostarczyły nowych i cennych danych w zakresie badań nad grzybem *Nectreilla pironii*, a w efekcie w sposób istotny poszerzyły możliwości zastosowania mikroorganizmów w produkcji lakazopodobnej oksydazy wielomiedziowej i eliminacji toksycznych zanieczyszczeń przemysłu tekstylnego.

Prof. dr hab. Katarzyna Hrynkiewicz

