

Gliwice 04.06.2023

## OCENA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Amandy Pacholak

pt. „*The exploitation of selected environmental bacteria in the removal of 5-nitrofurans derivatives*”

Przedłożona do oceny praca doktorska została wykonana przez mgr inż. Amandę Pacholak w Instytucie Technologii i Inżynierii Chemicznej Politechniki Poznańskiej. Promotorem pracy jest prof. dr hab. inż. Ewa Kaczorek uznana specjalistka z zakresu biotechnologii środowiskowej.

Podstawą wydania opinii jest pismo Pani Dziekan Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej prof. dr hab. inż. Ewy Kaczorek z dnia 25 kwietnia 2023 r. (RD-9/4/2023).

Głównym celem dysertacji było opracowanie skutecznych strategii usuwania syntetycznych antybiotyków w postaci pochodnych nitrofuranów ze środowiska. Jako narzędzie zaproponowano proces biologicznej degradacji przez bakterie środowiskowe. Aby uzyskać ten cel należało jednak zrozumieć w jaki sposób nitrofurany wpływają na szczepy bakterii środowiskowych.

Pochodne nitrofuranu jako antybiotyki posiadają szerokie spektrum działania lecz mogą mieć szkodliwy wpływ na środowisko lub stwarzać zagrożenie dla zdrowia ludzi. Wykorzystując zdolności metaboliczne niektórych bakterii środowiskowych, naukowcy dążą do opracowania strategii skutecznego usuwania lub degradacji tych związków, zmniejszając w ten sposób ich potencjalny negatywny wpływ. Związki te mogą wpływać na bakterie środowiskowe w różnoraki sposób, mogą być toksyczne dla bakterii, mogą hamować szlaki metaboliczne, mogą wykazywać zdolności antibakteryjne. Długotrwałe narażenie na pochodne 5-nitrofuranów może prowadzić do selekcji bakterii, które wykształciły mechanizmy oporności.

Zaproponowana w dysertacji tematyka badań jest nowoczesna i aktualna. Biodegradacja nitrofuranów jest intensywnie badana w celu lepszego zrozumienia mechanizmów tego procesu oraz identyfikacji mikroorganizmów i enzymów zaangażowanych w tę degradację. Badania nad biodegradacją nitrofuranów mają na celu opracowanie bardziej efektywnych metod usuwania tych związków z środowiska oraz ocenę potencjalnych skutków ubocznych i produktów ubocznych tego procesu. Ważne jest, aby kontynuować badania nad degradacją nitrofuranów i rozwijać metody, które będą skuteczne, ekonomiczne i bezpieczne dla środowiska, aby zmniejszyć obecność tych substancji i minimalizować ich potencjalne skutki dla zdrowia i ekosystemów. Tak więc przedłożona do oceny praca doktorska była zarazem dużym wyzwaniem badawczym.

Oceniana rozprawa doktorska to przykład ciekawego i starannie zaplanowanego projektu badawczego, którego wyniki wnoszą istotny wkład do rozszerzenia wiedzy na temat degradacji antybiotyków. Rezultaty pracy są bazą dla przyszłych zastosowań. Uważam, że postawiony przez Doktorantkę ambitny cel pracy został osiągnięty na wysokim światowym poziomie naukowym.

Przedstawiona do opinii rozprawa doktorska ma formę spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych. Pani mgr inż. Amanda Pacholak zawarła treść swoich badań w formie przewodnika napisanego w języku angielskim po związanych tematycznie publikacjach. W przewodniku Doktorantka zawarła następujące rozdziały: abstrakt, lista używanych skrótów, przegląd literaturowy, cel i zakres pracy, lista publikacji zaliczonych do cyklu, podsumowanie wyników, wnioski, literatura, aktywność naukowa oraz kopie publikacji tworzące cykl wraz z oświadczeniami o współautorstwie. Przewodnik został starannie i przejrzyście przygotowany, a obfita oprawa graficzna ułatwia śledzenie prezentowanych wyników.

Spójny tematycznie zbiór artykułów zatytułowany "*The exploitation of selected environmental bacteria in the removal of 5-nitrofurans derivatives*" stanowi pięć publikacji w czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania. Sumaryczny IF prac zaliczonych do cyklu wynosi 47, w tym trzy prace zamieszczone w czasopismach, których współczynnik oddziaływania IF przekracza 10. Należy podkreślić, że liczba punktów przyznanych przez MEiN w przypadku trzech prac wynosi 200 oraz dodatkowo dla pozostałych publikacji 100 i 70 pkt. Na uznanie zasługuje fakt, że w każdym przypadku Doktorantka jest pierwszym autorem, a w czterech publikacjach autorem korespondencyjnym, co świadczy o jej dominującym wkładzie w wykonywanie badań. Doktorantka deklaruje swój udział również w sformułowaniu i identyfikacji problemu naukowego poruszanego w pracy. Natomiast pani prof. Kaczorek, która nadzorowała badania również zadeklarowała, że Doktorantka jest wiodącym autorem w zamieszczonych publikacjach. Dzięki temu, że wyniki badań

realizowanych w ramach pracy doktorskiej zostały opublikowane w uznanych czasopismach (*International Journal of Environmental Research and Public Health, Journal of Hazardous Materials, Environmental Research, Science of the Total Environment*) mogą zainteresować nie tylko ekspertów z branży ale również szeroką społeczność naukową. Praca doktorska jest wynikiem realizacji grantu OPUS, którym kierowała prof. Kaczorek.

Z ogromnym zainteresowaniem przeglądałam zestawienie dorobku naukowego Doktorantki, odkrywając kolejne fascynujące osiągnięcia Doktorantki. Doktorantka jest współautorem 23 prac w czasopismach z listy JCR i może pochwalić się już wysokim H-idexem wynoszącym 9. Innym niesłychanie ważnym faktem w bogatym życiu naukowym Doktorantki jest kierownictwo grantem PRELUDIUM finansowanym przez NCN. Doktorantka była jeszcze wykonawcą w aż 5 innych projektach finansowanych przez NCN i NCBiR oraz licznych dotacji na badania finansowych przez Politechnikę Poznańską. Doktorantka w trakcie realizacji pracy doktorskiej przebywała co roku na stażach trwających od 1 do 5 miesięcy w następujących Uczelniach zagranicznych: Ohio State University (USA), University of Technology (Sydney, Australia), University of Helsinki (Finlandia) oraz Beijing University of Technology (Chiny). Jest współautorką 17 wystąpień ustnych oraz 24 posterów prezentowanych na międzynarodowych krajowych i międzynarodowych oraz laureatką wielu nagród. Na wyróżnienie zasługuje fakt otrzymania w 2022 roku rocznego stypendium START dla wybitnych młodych uczonych na początku kariery naukowej posiadających udokumentowane osiągnięcia w swojej dziedzinie badań. Wszystkie wymienione powyżej aktywności naukowe są niesłychanie ważne dla rozwoju znakomitej ścieżki naukowej. Ten imponujący dorobek naukowy uzyskany został przez Doktorantkę w tak młodym wieku!

Badania wykonane w ramach doktoratu są spójne, Doktorantka podjęła się trudnego wyzwania i konsekwentnie go realizowała. Każde z zagadnień opatrzone jest odrębnym wprowadzeniem do tematu, częścią opisującą wyniki oraz podsumowaniem.

Tematyka pracy jest bardzo szeroko opisywana w literaturze. Tak więc wybór cytowanych pozycji to trudne wyzwanie. Doktorantka odwołuje się do powyżej 200 pozycji. Uważam, że w przewodniku powinny znaleźć się tylko te najważniejsze, co ułatwiłoby recenzentowi szybki dostęp do tych najistotniejszych. Wszakże wszystkie publikacje stanowiące cykl są załączone do przewodnika i tam zawarta jest cała szczegółowa literatura.

Z przyjemnością czyta się 20 stronicowy wstęp literaturowy, w którym Doktorantka w sposób syntetyczny nakreśla problematykę badań. Scharakteryzowała nitrofurany, wytłumaczyła zakaz ich stosowanie u zwierząt hodowlanych, zaznaczyła, że jednak antybiotyki te ciągle są wykrywane w

żywności pochodzenia zwierzęcego. Dodatkowo zawarła we wstępie problematykę stosowania antybiotyków i wynikającą z niej ich obecność w środowisku. Wprowadzenie kończy omówienie oddziaływania nitrofuranów na mikroorganizmy oraz strategii ich usuwania ze środowiska.

Przewodnik czyta się z przyjemnością, Doktorantka w sposób niezwykle uporządkowany przedstawia kolejne zagadnienia umieszczone w publikacjach z cyklu nawiązując do literatury i naświetlając wszystkie niezbędne problemy tak aby cel pracy i wyniki badań były zrozumiałe. W końcu warto również pochwalić bardzo staranną redakcję pracy. Doktorantka wykazała się umiejętnością prowadzenia pracy badawczej i w sposób poprawny formułowała wnioski na podstawie obszernego i wartościowego materiału doświadczalnego. Prace eksperymentalne były prowadzone z użyciem pojedynczych komórek bakteryjnych oraz konsorcjów mikroorganizmów pod kątem ich krótkotrwałej ekspozycji na nitrofurantoinę oraz pojedynczych szczepów poddanych długotrwałej ekspozycji na nitrofurantoinę i furaltadon.

W szczególności w **PUBLIKACJI P1** została opisana izolacja pojedynczych szczepów bakteryjnych z miejskiego i wiejskiego osadu czynnego, ich zdolność do degradacji nitrofurantoiny oraz wpływ leku na komórki bakteryjne. Potwierdzono, że wyizolowane szczepy mogą wykorzystywać nitrofurantoinę jako źródło węgla i energii. W **PUBLIKACJI P3** zawarto wyniki badań dotyczących biodegradacji nitrofurantoiny przez mikroorganizmy z dwóch środowisk wodnych. Zidentyfikowano produkty biodegradacji oraz przeanalizowano zmiany w strukturze bioróżnorodności bakterii. Potwierdzono, że obecność nitrofurantoiny w hodowli bakteryjnej wpływa istotnie na strukturę bakterii. Degradacja nitrofurantoiny doprowadziła do powstania stabilnych produktów (1-aminohydantoina, semikarbazyd i hydrazyna). W **PUBLIKACJI 5** proces biodegradacji prowadzono za pomocą 3 różnych nowo wyizolowanych szczepów bakterii oraz przedstawiono zmiany w komórkach nitrofurantoiny i wpływ produktów degradacji na badane szczepy. Te nowe szczepy okazały się wysoce aktywne w biodegradacji oraz wykazywały najmniejsze zmiany we właściwościach komórek.

W **PUBLIKACJACH P2 i P4** opisano proces poddania pojedynczych szczepów bakteryjnych na długotrwały kontakt z zarówno nitrofurantoiną jak i furaltadonem. Ekspozycja spowodowała zmiany w komórkach na poziomie ich właściwości morfologicznych, biosyntezy białek, efektów mutagennych oraz zwiększenie stresu oksydacyjnego.

Wszystkie powyżej opisane badania potwierdzają możliwość biodegradacji pochodnych nitrofuranonów oraz powstawania stabilnych produktów pośrednich, które istotnie wpływają na właściwości komórek. Tak więc mikrobiom środowisk wodnych może zostać uszkodzony.

Długotrwała ekspozycja może przyczynić się do istotnych zmian struktury komórek i ich metabolizmu. Przedstawiona do recenzji praca przyczyniła się do rozwinięcia wiedzy dotyczącej biodegradacji nitrofuranów i może być w przyszłości pomocna przy projektowaniu technologii bioremediacji miejsc skażonych antybiotykami. Doktorantka przedstawiła również ograniczenia i przyszłe kierunki rozwoju badań.

Wszystkie publikacje stanowiące cykl zostały poddane recenzji i opublikowane w czasopiśmie z listy JCR o wysokich współczynnikach oddziaływania. Dlatego też rola recenzenta jest ograniczona i polega na wyszczególnieniu i ocenie istotnych osiągnięć naukowych. Za najważniejsze elementy naukowe recenzowanej pracy uważam:

- izolację i zidentyfikowanie czystych szczepów bakteryjnych różnego pochodzenia środowiskowego (ścieki miejskie i komunalne, gleba, zbiorniki wodne),
- opracowanie efektywnego procesu biodegradacji pochodnych nitrofuranów zarówno przez pojedyncze szczepy jak i konsorcja mikroorganizmów z różnych środowisk,
- oznaczenie produktów biotransformacji nitrofurantoiny oraz określenie ich oddziaływania na szczepy bakterii,
- wyznaczenie i opisanie wpływu pochodnych nitrofuranów na aktywność metaboliczną komórek i właściwości komórek, takie jak przepuszczalność błon i hydrofobowość powierzchni,
- ocenę długotrwałego oddziaływania pojedynczych szczepów na nitrofurantoinę i furaltadon i określenie kształtu i struktury komórek,
- ocenę odpowiedzi biologicznej komórek poddanych działaniu nitrofuranów przez 12 miesięcy poprzez analizę zmian przepuszczalności błony komórkowej, hydrofobowości powierzchni i profilu kwasów tłuszczowych,
- ocenę wpływu ekspozycji szczepów na nitrofurany poprzez profil metaboliczny, stopień uszkodzenia materiału genetycznego, aktywność metaboliczną i reakcję stresową w komórce.

Podczas czytania pracy szukałam odpowiedzi na następujące kwestie:

- Czy można już na tym etapie zgrubnie ocenić na podstawie przeprowadzonych badań czy opracowana metoda biodegradacji może być efektywna również ekonomicznie?
- Jakie mogą pojawić się problemy przy projektowaniu technologii bioremediacji?
- Czy opracowana metoda może konkurować z innymi opisanymi w literaturze lub stosowanymi w praktyce?

Doktorantka wykazała się wysokimi kwalifikacjami projektowania i prowadzenia eksperymentów w laboratorium chemii bioorganicznej. Stosowała konwencjonalne metody, np.

różne kolorymetryczne testy biochemiczne oraz uzupełniała je nowoczesnymi technikami, takimi jak mikroskopia sił atomowych, cytometria przepływowa, stosowała metabolomikę i metagenomikę. Na wyróżnienie zasługuje fakt, że otrzymane wyniki analiz zostały w sposób bardzo dokładny opisane i bardzo przejrzysto zobrazowane, co świadczy o dobrym opanowaniu technik przez Doktorantkę.

Na podstawie oceny pracy doktorskiej Pani mgr inż. Amandy Pacholak, pt.: *“The exploitation of selected environmental bacteria in the removal of 5-nitrofurans derivatives”* stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia ustawowe i zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę więc do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Politechniki Poznańskiej o dopuszczenie mgr inż. Amandy Pacholak do dalszych etapów przewodu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk chemicznych.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową pracy doktorskiej oraz jej aplikacyjny charakter, nowatorskie osiągnięcia, ponadprzeciętny dorobek naukowy, jak i imponujący udział w kierowaniu projektami w tak krótkim czasie prowadzenia pracy naukowej, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

