

Częstochowa, dn. 14.04.2026 r.

Dr hab. inż. Ewa Wiśniowska, prof. PCz.
Katedra Sieci i Instalacji Sanitarnych
Wydział Infrastruktury i Środowiska
Politechnika Częstochowska

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

“Determination of the mechanism and optimization of the conditions of the process of removing colored aromatic compounds by selected Basidiomycota”

Autorka: M.Sc. Ruchi Manishkumar Upadhyay

Promotor: Prof. dr hab. inż. Wioletta Przysaś

Jednostka: Politechnika Śląska, Wydział Energetyki i Inżynierii Środowiska

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Ruchi Manishkumar Upadhyay została przygotowana na zlecenie Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka, na podstawie przedłożonego manuskryptu pracy pt.: *“Determination of the mechanism and optimization of the conditions of the process of removing colored aromatic compounds by selected Basidiomycota”*, wykonanej na Wydziale Energetyki i Inżynierii Środowiska Politechniki Śląskiej, pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Wioletty Przysaś.

Recenzję opracowano zgodnie z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z uwzględnieniem wymagań określonych w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. 2024, poz. 1571, z późn. zm.), a także standardów przyjętych dla ocen rozpraw doktorskich w dyscyplinie inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka. Podstawę opracowania recenzji stanowił przekazany egzemplarz rozprawy doktorskiej wraz z jej częścią opisową oraz wynikami badań własnych Doktorantki.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska dotyczy zagadnienia o wysokiej aktualności naukowej oraz istotnym znaczeniu praktycznym, jakim jest usuwanie barwników syntetycznych ze środowiska wodnego z wykorzystaniem metod biologicznych. Problematyka ta wpisuje się w jeden z kluczowych obszarów współczesnej inżynierii środowiska, skoncentrowany na opracowywaniu efektywnych, niskoemisyjnych oraz zgodnych z zasadami zrównoważonego rozwoju technologii oczyszczania ścieków. W dobie zastrzegających się regulacji środowiskowych oraz

Politechnika Częstochowska

Wydział Infrastruktury i Środowiska

ul. Dąbrowskiego 73, 42-201 Częstochowa

tel. +48 34 325 04 63, e-mail: biuro.dziekana.wiis@pcz.pl

wis.pcz.pl



rosnącej presji na ograniczenie negatywnego oddziaływania przemysłu na środowisko naturalne, zagadnienia związane z eliminacją trwałych zanieczyszczeń organicznych, do których zaliczają się barwniki syntetyczne, nabierają szczególnego znaczenia.

Autorka w sposób trafny i przekonujący wskazuje, że problem obecności barwników w środowisku ma charakter globalny i wynika zarówno z bardzo dużej skali ich produkcji, jak i niewystarczającej efektywności konwencjonalnych metod oczyszczania ścieków przemysłowych. Barwniki syntetyczne, ze względu na swoją złożoną strukturę chemiczną, wysoką trwałość oraz odporność na biodegradację, stanowią szczególnie trudną do usunięcia grupę zanieczyszczeń. Ich obecność w środowisku wodnym prowadzi nie tylko do pogorszenia jakości wód poprzez zmianę właściwości optycznych, ale również do szeregu negatywnych skutków ekologicznych, w tym ograniczenia procesów fotosyntezy, zaburzenia funkcjonowania łańcuchów troficznych oraz potencjalnego działania toksycznego i mutagennego wobec organizmów żywych. W tym kontekście poszukiwanie alternatywnych metod usuwania barwników, opartych na procesach biologicznych, należy uznać za kierunek badań w pełni uzasadniony. Metody biologiczne, w tym w szczególności wykorzystanie mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji związków o charakterze ksenobiotycznym, stanowią obiecującą alternatywę dla tradycyjnych metod fizykochemicznych, które często wiążą się z wysokimi kosztami eksploatacyjnymi oraz generowaniem wtórnych zanieczyszczeń. Wykorzystanie grzybów białej zgnilizny drewna, charakteryzujących się szerokim spektrum aktywności enzymatycznej oraz zdolnością do rozkładu złożonych związków aromatycznych, wpisuje się w aktualne trendy rozwoju biotechnologii środowiskowej, ukierunkowane na wykorzystanie naturalnych mechanizmów metabolicznych w procesach oczyszczania środowiska.

Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że Autorka nie ogranicza się wyłącznie do oceny efektywności procesu usuwania barwników, lecz podejmuje próbę poznania mechanizmów jego przebiegu, co istotnie podnosi wartość naukową rozprawy. W odróżnieniu od wielu prac o charakterze stricte aplikacyjnym, koncentrujących się głównie na osiągnięciu wysokiej skuteczności usuwania zanieczyszczeń, Autorka podejmuje wysiłek zrozumienia podstawowych procesów zachodzących na poziomie biochemicznym i komórkowym.

Zakres pracy obejmuje bowiem jednocześnie optymalizację warunków procesu (w tym analizę wpływu kluczowych parametrów operacyjnych), próbę identyfikacji mechanizmów biodegradacji i biosorpcji, ocenę aktywności enzymatycznej układów biologicznych, badania ekotoksykologiczne pozwalające na ocenę efektu środowiskowego procesu, a także analizy omiczne (transkryptomiczne i proteomiczne), mające na celu uchwycenie odpowiedzi organizmów na poziomie molekularnym. Tak wielopoziomowe podejście badawcze, obejmujące zarówno skalę makroskopową

(efektywność procesu), jak i mikroskopową (mechanizmy molekularne), należy uznać za zgodne z aktualnymi trendami rozwoju badań w inżynierii środowiska i biotechnologii, gdzie coraz większy nacisk kładzie się na integrację danych procesowych i biologicznych. Podejście to wskazuje zarazem na dużą świadomość badawczą Autorki oraz jej dążenie do kompleksowego ujęcia analizowanego problemu. Należy również podkreślić, że włączenie badań ekotoksykologicznych stanowi istotne uzupełnienie klasycznych analiz efektywności procesu, pozwalając na ocenę rzeczywistego wpływu uzyskanych efektów na środowisko, a nie jedynie na parametry technologiczne. Szerokie i wielowątkowe ujęcie problemu wiąże się jednak z naturalnym ryzykiem rozproszenia głównego nurtu analizy oraz nierównomiernego poziomu opracowania poszczególnych zagadnień. W pracy widoczne jest, że nie wszystkie obszary badawcze zostały rozwinięte z jednakową głębokością metodologiczną i interpretacyjną, co wynika zarówno z ich zróżnicowanego charakteru, jak i z ograniczeń eksperymentalnych. W szczególności dotyczy to analizy mechanizmów zachodzących procesów opartej na analizach omicznych, w której – mimo dużego potencjału poznawczego – zakres i sposób opracowania danych nie zawsze pozwala na formułowanie jednoznacznych i w pełni ugruntowanych wniosków.

Metodyka badań została opracowana szczegółowo i obejmuje szeroki wachlarz technik eksperymentalnych, co należy ocenić pozytywnie zarówno z punktu widzenia kompletności podejścia badawczego, jak i możliwości wieloaspektowej interpretacji uzyskanych wyników. Autorka wykorzystuje dwa gatunki grzybów należących do grupy tzw. grzybów białej zgnilizny, tj. *Trametes versicolor* oraz *Pleurotus ostreatus*, które są powszechnie uznawane za organizmy o wysokim potencjale degradacyjnym wobec związków aromatycznych. Wybór tych modeli biologicznych należy uznać za uzasadniony, ponieważ pozwala on na porównanie zdolności degradacyjnych organizmów różniących się profilem enzymatycznym oraz strategią metabolizmu ksenobiotyków. W pracy analizowana jest zdolność badanych szczepów do usuwania barwników reprezentujących różne klasy chemiczne, co istotnie zwiększa zakres poznawczy badań. Takie podejście umożliwia ocenę uniwersalności zastosowanej metody oraz identyfikację potencjalnych zależności pomiędzy strukturą chemiczną barwnika a mechanizmem jego usuwania. Na szczególną uwagę zasługuje uwzględnienie zarówno biodegradacji, jak i biosorpcji jako współwystępujących mechanizmów eliminacji zanieczyszczeń. Podejście to jest zgodne z aktualnym stanem wiedzy, według którego usuwanie barwników przez mikroorganizmy ma charakter złożony i wieloetapowy, obejmujący zarówno procesy fizykochemiczne (adsorpcja na powierzchni biomasy), jak i przemiany enzymatyczne prowadzące do transformacji związków. Włączenie obu tych mechanizmów do analizy pozwala na bardziej

realistyczne odwzorowanie przebiegu procesu oraz uniknięcie jego nadmiernego uproszczenia.

Istotnym elementem metodyki jest również szeroki zakres analiz parametrów procesowych. Autorka bada wpływ kluczowych czynników operacyjnych, takich jak pH, temperatura, rodzaj i dostępność źródeł węgla oraz azotu, warunki prowadzenia hodowli (statyczne i dynamiczne), a także sposób immobilizacji biomasy. Takie podejście umożliwia identyfikację warunków sprzyjających maksymalizacji efektywności procesu oraz stanowi podstawę do ewentualnej optymalizacji technologicznej. W szczególności uwzględnienie różnych form biomasy (wolnej, immobilizowanej oraz inaktywowanej) pozwala na ocenę wpływu właściwości fizycznych i biologicznych układu na przebieg procesu usuwania barwników. Na pozytywną ocenę zasługuje także zastosowanie podejścia wieloetapowego, obejmującego zarówno badania w skali laboratoryjnej, jak i próby ich weryfikacji w warunkach zbliżonych do rzeczywistych (układy bioreaktorowe). Takie podejście wskazuje na próbę powiązania badań podstawowych z ich potencjalnym zastosowaniem praktycznym, co jest szczególnie istotne w przypadku prac z zakresu inżynierii środowiska. Wyniki badań przedstawione w pracy są obszerne, wielowątkowe i w przeważającej mierze poprawnie udokumentowane, co świadczy o dużym nakładzie pracy eksperymentalnej oraz konsekwencji w realizacji przyjętego programu badawczego. Autorka wykazała wysoką efektywność usuwania badanych barwników, sięgającą około 96% w warunkach uznanych za optymalne, co należy uznać za wynik bardzo dobry i wskazujący na znaczący potencjał zastosowanych układów biologicznych w procesach oczyszczania ścieków zawierających związki barwne. W szczególności uzyskane rezultaty potwierdzają, że grzyby białej zgnilizny mogą stanowić efektywne narzędzie w usuwaniu związków o złożonej strukturze aromatycznej, które są trudne do eliminacji metodami konwencjonalnymi.

Jednocześnie należy zauważyć, że pomimo szerokiego zakresu zastosowanych metod, nie wszystkie elementy metodyki zostały rozwinięte z jednakową szczegółowością, a w niektórych przypadkach brakuje pełnej spójności pomiędzy zakresem eksperymentu a formułowanymi wnioskami. W szczególności dotyczy to metod stosowanych do rozróżniania mechanizmów procesu oraz powiązania wyników eksperymentalnych z analizami o charakterze molekularnym, co zostanie szerzej omówione w dalszej części recenzji. Należy także podkreślić, że interpretacja uzyskanych wyników wymaga większej ostrożności oraz bardziej jednoznacznego rozróżnienia pomiędzy obserwowanymi efektami procesowymi a rzeczywistymi przemianami chemicznymi zachodzącymi w układzie. Podstawowym wskaźnikiem efektywności procesu przyjętym w pracy jest bowiem stopień dekoloryzacji oznaczany metodą spektrofotometryczną UV-Vis, oparty na pomiarze zmian absorbancji roztworu. Metoda ta, choć powszechnie stosowana i użyteczna jako narzędzie oceny wstępnej, ma charakter pośredni

i nie pozwala na jednoznaczne potwierdzenie degradacji związków chemicznych, a tym bardziej ich pełnej mineralizacji. W szczególności należy mieć na uwadze, że zmiana intensywności barwy roztworu może wynikać z różnych procesów, takich jak sorpcja barwnika na powierzchni biomasy, zmiany jego struktury prowadzące do zaniku właściwości chromoforowych, czy też powstawanie produktów pośrednich o mniejszej intensywności absorpcji w analizowanym zakresie długości fal. W każdym z tych przypadków mamy do czynienia z odmiennym mechanizmem procesu, który niekoniecznie oznacza rzeczywisty rozkład związku do form mniej szkodliwych środowiskowo. W pracy obserwuje się miejscami utożsamienie spadku intensywności barwy z biodegradacją, co z metodologicznego punktu widzenia stanowi uproszczenie i może prowadzić do nadinterpretacji uzyskanych wyników. Brak uzupełnienia analiz o bardziej bezpośrednie metody identyfikacji produktów reakcji, takie jak techniki chromatograficzne (np. HPLC, LC-MS) lub oznaczenia parametrów sumarycznych (TOC, COD), ogranicza możliwość jednoznacznego określenia stopnia rzeczywistej transformacji chemicznej badanych związków. W konsekwencji należy uznać, że przedstawione wyniki w sposób wiarygodny dokumentują wysoką skuteczność procesu w zakresie dekoloryzacji roztworów barwników, jednak wnioski dotyczące ich pełnej biodegradacji lub mineralizacji powinny być formułowane z większą ostrożnością i jednoznacznie odnoszone do ograniczeń zastosowanej metodyki badawczej.

Pewne zastrzeżenia można także sformułować odnośnie części pracy dotyczącej mechanizmów rozkładu, która – pomimo swojej koncepcyjnej wartości – nie została w pełni poparta odpowiednio wiarygodnymi danymi eksperymentalnymi. Autorka deklaruje identyfikację mechanizmów usuwania barwników w oparciu o wyniki analiz enzymatycznych oraz omicznych, co w założeniu stanowi podejście nowoczesne i zgodne z aktualnymi trendami badawczymi. Jednakże rzeczywista siła dowodowa tych danych, w obecnym kształcie pracy, jest ograniczona i nie zawsze uzasadnia formułowanie jednoznacznych wniosków. W szczególności należy zwrócić uwagę na część proteomiczną, która – choć potencjalnie bardzo wartościowa poznawczo – została przeprowadzona w sposób istotnie ograniczający możliwość wiarygodnej interpretacji wyników. Jak wynika z opisu metodyki, analizy proteomiczne wykonano bez uwzględnienia zmienności biologicznej („only a single sample... without biological replicates”, s. 47). Z punktu widzenia standardów badań proteomicznych, w szczególności w analizach o charakterze ilościowym, uniemożliwia to przeprowadzenie rzetelnej analizy statystycznej oraz ocenę zmienności biologicznej badanych układów. W konsekwencji nie jest możliwe wiarygodne określenie, czy obserwowane różnice w poziomie ekspresji białek mają charakter rzeczywisty, czy też wynikają z fluktuacji eksperymentalnych lub technicznych. Dodatkowo, Autorka wskazuje brak zastosowania filtracji wyników opartej na wartościach statystycznych

(„no p-value-based filtering was performed”, s. 47) , a jednocześnie stosuje arbitralne kryterium różnicowania oparte na zmianie poziomu ekspresji (\log_2FC). Takie podejście zwiększa ryzyko interpretacji przypadkowych zmian jako istotnych biologicznie i nie spełnia standardów obowiązujących w analizach proteomicznych. W konsekwencji uzyskane wyniki proteomiczne nie mogą stanowić podstawy do ilościowej analizy różnicowej ani do formułowania wniosków o charakterze uogólniającym. Powinny być one traktowane wyłącznie jako obserwacje eksploracyjne, wskazujące potencjalne kierunki dalszych badań, wymagające jednak potwierdzenia w eksperymentach z zastosowaniem rygorystycznych metod analizy statystycznej. Pomimo tych ograniczeń, w pracy pojawiają się wnioski dotyczące „przeprogramowania metabolicznego” oraz specyficznych odpowiedzi komórkowych na obecność badanych barwników, co w obecnym stanie danych należy uznać za nadinterpretację wyników. Formułowanie tego typu wniosków wymaga bowiem nie tylko jakościowo poprawnych danych omicznych, ale również ich statystycznej walidacji oraz – co równie istotne – powiązania z niezależnymi wynikami eksperymentalnymi (np. analizą metabolitów czy aktywności enzymatycznej w sposób ilościowy). Podsumowując, należy stwierdzić, że ta część mechanistyczna pracy stanowi interesującą i ambitną próbę interpretacji procesów zachodzących na poziomie molekularnym, jednak w obecnym kształcie ma ona charakter wstępny i eksploracyjny. Wymaga wyraźnego ograniczenia zakresu formułowanych wniosków oraz jednoznacznego wskazania ograniczeń metodologicznych, tak aby zachować właściwy rygor naukowy w interpretacji uzyskanych wyników.

W przypadku analiz transkryptomicznych sytuacja jest korzystniejsza, jednak również tutaj pojawiają się istotne ograniczenia. Autorka stosuje kryterium istotności oparte na wartości „raw p-value < 0.05” (s. 44), bez jednoznacznego wskazania zastosowania korekty wielokrotnego testowania. W analizach obejmujących tysiące genów brak takiej korekty prowadzi do zwiększonego ryzyka uzyskania wyników fałszywie dodatnich, co istotnie ogranicza wiarygodność wniosków. Konsekwencją powyższego jest ograniczona wiarygodność analiz funkcjonalnych, w tym identyfikacji wzbogaconych szlaków metabolicznych czy interpretacji odpowiedzi komórkowej organizmu na obecność barwników. Wnioski dotyczące zaangażowania określonych grup genów czy procesów biologicznych powinny być zatem formułowane z większą ostrożnością i jednoznacznie odnosić się do zastosowanych ograniczeń analitycznych.

Kolejnym istotnym problemem metodologicznym jest sposób rozróżniania mechanizmów biosorpcji i biodegradacji, który stanowi kluczowy element interpretacji uzyskanych wyników. Autorka wykorzystuje w tym celu procedurę desorpcji w roztworze metanolu („70% (v/v) methanol solution”, s. 33), traktując ją jako narzędzie umożliwiające ocenę udziału procesów sorpcyjnych. Należy jednak podkreślić,

że metoda ta ma charakter jedynie przybliżony i nie pozwala na jednoznaczne rozstrzygnięcie mechanizmu usuwania zanieczyszczeń. Zastosowanie metanolu jako czynnika desorpcyjnego może bowiem wpływać nie tylko na związki zaadsorbowane na powierzchni biomasy, ale również na strukturę samej biomasy, w tym jej komponenty ściany komórkowej, a także na produkty pośrednie powstające w trakcie biodegradacji. W rezultacie uwolnione do roztworu substancje nie muszą odpowiadać wyłącznie pierwotnie zaadsorbowanemu barwnikowi, lecz mogą obejmować także jego transformowane formy. Dodatkowo brak pełnego bilansu masy oraz identyfikacji produktów reakcji uniemożliwia jednoznaczne określenie, jaka część barwnika uległa rzeczywistej degradacji, a jaka została jedynie przeniesiona do innej fazy. W konsekwencji przedstawione w pracy rozróżnienie mechanizmów biosorpcji i biodegradacji należy traktować jako jakościowe i przybliżone. Wnioski w tym zakresie wymagają wyraźnego ograniczenia oraz uzupełnienia o dodatkowe metody analityczne, takie jak np. identyfikacja produktów reakcji, które pozwoliłyby na bardziej jednoznaczne określenie charakteru zachodzących przemian.

Uwagi krytyczne dotyczą również części statystycznej pracy, która – mimo deklaratywnie szerokiego zakresu zastosowanych narzędzi analitycznych – nie zawsze została opracowana z należytą konsekwencją metodologiczną i przejrzystością interpretacyjną. Autorka wskazuje na wykorzystanie szeregu metod statystycznych, jednak w wielu przypadkach brak jest jednoznacznego przypisania konkretnych testów do analizowanych danych, a także szczegółowego uzasadnienia ich doboru w kontekście charakteru zmiennych i struktury eksperymentu. Szczególne zastrzeżenia budzi zastosowanie testów jednostronnych („one-tailed t-tests”, s. 57). Wykorzystanie tego typu testów jest metodologicznie uzasadnione jedynie w sytuacji, gdy hipoteza badawcza ma jednoznacznie określony kierunek (np. przewidywany wzrost lub spadek analizowanego parametru), a wybór testu został dokonany przed przeprowadzeniem analizy danych. W pracy brak jest jednak wyraźnego sformułowania hipotez kierunkowych, które uzasadniałyby zastosowanie testów jednostronnych. W konsekwencji istnieje ryzyko, że dobór metody statystycznej mógł być podyktowany uzyskanymi wynikami, co z punktu widzenia poprawności wnioskowania statystycznego stanowi podejście niepożądane. Dodatkowo nie przedstawiono informacji dotyczących weryfikacji podstawowych założeń stosowanych testów, takich jak normalność rozkładu danych czy jednorodność wariancji. Brak tych elementów ogranicza możliwość oceny poprawności zastosowanych metod oraz wpływa na wiarygodność uzyskanych wyników. W kontekście licznych analiz prowadzonych dla różnych kombinacji parametrów procesowych należałoby również oczekiwać odniesienia do problemu wielokrotnego testowania oraz potencjalnej kumulacji błędów statystycznego.

W części ekotoksykologicznej pracy widoczna jest niespójność pomiędzy przywoływanymi standardami badawczymi a rzeczywistym przebiegiem

eksperymentów. Autorka odwołuje się do różnych norm, w tym OECD 211 oraz ISO 6341, jednak opis procedury wskazuje na przeprowadzenie testu krótkoterminowego z odczytami po 24 i 48 godzinach („After 24h and 48h...”, s. 49). co jest charakterystyczne dla testu ostrej toksyczności OECD 202. Niespójność ta świadczy o braku precyzji metodologicznej oraz może wprowadzać niejasność co do zakresu i interpretacji uzyskanych wyników. Należy podkreślić, że wybór odpowiedniego standardu badawczego ma kluczowe znaczenie dla interpretacji wyników testów ekotoksykologicznych, ponieważ różne procedury odnoszą się do odmiennych aspektów oddziaływania substancji na organizmy żywe (toksyczność ostra vs przewlekła). W związku z tym błędne lub nieprecyzyjne przypisanie metod może prowadzić do nieuprawnionych wniosków dotyczących rzeczywistego wpływu badanych układów na środowisko. W konsekwencji należy uznać, że część ekotoksykologiczna pracy, choć stanowi cenne uzupełnienie badań procesowych, wymaga bardziej ostrożnej interpretacji oraz wyraźnego wskazania ograniczeń zastosowanej metodyki.

Na uwagę zasługuje również ograniczona aplikacyjność uzyskanych wyników, wynikająca przede wszystkim z warunków, w jakich prowadzone były eksperymenty. Badania realizowano w układach silnie kontrolowanych, w warunkach aseptycznych („under aseptic conditions”, s. 27), co – choć uzasadnione z punktu widzenia powtarzalności i kontroli przebiegu eksperymentu – w istotnym stopniu ogranicza możliwość bezpośredniego odniesienia wyników do rzeczywistych warunków pracy instalacji oczyszczania ścieków. W warunkach laboratoryjnych eliminowana jest obecność naturalnej mikroflory towarzyszącej, która w rzeczywistych układach technologicznych odgrywa istotną rolę w kształtowaniu przebiegu procesów biodegradacyjnych. W rzeczywistych ściekach przemysłowych i komunalnych występuje złożona i dynamiczna społeczność mikroorganizmów, które mogą zarówno konkurować z wprowadzonymi organizmami o substraty, jak i wpływać na ich aktywność metaboliczną poprzez interakcje symbiotyczne lub antagonistyczne. Obecność tej mikroflory może prowadzić do znaczących zmian efektywności procesu, zarówno w kierunku jej obniżenia (np. poprzez konkurencję o źródła węgla), jak i potencjalnie jej modyfikacji (np. poprzez współdziałanie różnych szlaków metabolicznych). Dodatkowo należy uwzględnić, że rzeczywiste ścieki charakteryzują się wysoką zmiennością składu fizykochemicznego, co może wpływać zarówno na stabilność układu biologicznego, jak i na przebieg procesów sorpcyjnych oraz enzymatycznych. W szczególności zmienność parametrów takich jak pH, przewodność, ładunek zanieczyszczeń czy dostępność tlenu może prowadzić do odmiennych efektów niż obserwowane w warunkach laboratoryjnych. W związku z powyższym należy uznać, że przedstawione w pracy wyniki mają charakter przede wszystkim poznawczy i stanowią podstawę do dalszych badań, jednak ich bezpośrednie przełożenie na skalę techniczną wymaga dodatkowej weryfikacji w warunkach zbliżonych do rzeczywistych. W szczególności

wskazane byłoby przeprowadzenie badań z wykorzystaniem rzeczywistych ścieków oraz w układach niejałowych, co pozwoliłoby na ocenę stabilności i efektywności procesu w warunkach odpowiadających praktyce inżynierskiej.

Pomimo wskazanych zastrzeżeń należy jednoznacznie podkreślić, że rozprawa stanowi wartościowe opracowanie naukowe, wpisujące się w aktualne kierunki rozwoju biotechnologii środowiskowej. Do jej najważniejszych osiągnięć należy zaliczyć kompleksowe podejście badawcze, integrujące analizę procesową z próbą interpretacji mechanizmów na poziomie molekularnym, co stanowi istotny krok w kierunku lepszego zrozumienia procesów biodegradacji zanieczyszczeń.

Uwagi szczegółowe

s. 33 – Zastosowanie spektrofotometrii UV-Vis jako głównego wskaźnika efektywności procesu (oznaczanie stopnia dekoloryzacji) nie pozwala na jednoznaczne potwierdzenie degradacji badanych związków, a tym bardziej ich mineralizacji. Metoda ta odzwierciedla jedynie zmiany właściwości optycznych roztworu, które mogą wynikać zarówno z transformacji chemicznej, jak i z sorpcji barwnika na powierzchni biomasy lub powstawania produktów pośrednich o zmienionych właściwościach absorpcyjnych. W związku z tym zasadne byłoby uzupełnienie badań o oznaczenia parametrów sumarycznych (np. TOC, ChZt) lub identyfikację produktów reakcji, co pozwoliłoby na bardziej jednoznaczną ocenę charakteru zachodzących przemian.

s. 33 – Zastosowanie procedury desorpcji w roztworze metanolu jako narzędzia rozróżniania udziału biosorpcji i biodegradacji nie stanowi metody rozstrzygającej. Metanol może wpływać zarówno na związki zaadsorbowane, jak i na strukturę biomasy oraz produkty transformacji, co utrudnia jednoznaczną interpretację uzyskanych wyników. W konsekwencji przedstawione rozróżnienie mechanizmów należy traktować jako przybliżone i wymagające potwierdzenia innymi metodami.

s. 42 – Ograniczony zakres analiz transkryptomicznych, w szczególności brak pełnego zestawu wariantów eksperymentalnych oraz brak odniesienia do wszystkich badanych układów biologicznych, ogranicza możliwość uogólniania wyników. Wnioski dotyczące odpowiedzi komórkowej organizmów powinny być jednoznacznie zawężone do analizowanych warunków eksperymentalnych.

s. 44 – Brak jednoznacznej informacji o zastosowaniu korekty wielokrotnego testowania (np. FDR) w analizach RNA-seq stanowi istotne ograniczenie metodologiczne. W analizach obejmujących dużą liczbę jednoczesnych testów statystycznych zastosowanie nieskorygowanych wartości p prowadzi do zwiększonego ryzyka wyników fałszywie dodatnich, co może wpływać na interpretację różnicowej ekspresji genów oraz analiz funkcjonalnych.

s. 47 – Brak filtracji wyników proteomicznych na podstawie wartości statystycznych („no p-value-based filtering was performed”) oraz stosowanie wyłącznie kryteriów opartych

na zmianie poziomu ekspresji zwiększa ryzyko interpretacji przypadkowych fluktuacji jako zmian istotnych biologicznie.

s. 57 – Brak uzasadnienia dla zastosowania testów jednostronnych („one-tailed t-tests”) oraz brak jednoznacznego sformułowania hipotez kierunkowych osłabia wiarygodność analiz statystycznych. Dodatkowo nie przedstawiono informacji dotyczących weryfikacji założeń testów (normalność rozkładu, jednorodność wariancji), co utrudnia ocenę poprawności zastosowanych metod.

s. 27 – Prowadzenie badań w warunkach aseptycznych, choć uzasadnione z punktu widzenia kontroli eksperymentu, ogranicza możliwość bezpośredniego odniesienia wyników do warunków rzeczywistych. Brak uwzględnienia wpływu naturalnej mikroflory oraz zmienności składu ścieków może prowadzić do zawyżenia efektywności procesu w stosunku do warunków praktycznych.

s. 48–49 – Niespójność metodologiczna w odniesieniu do standardów ekotoksykologicznych (odwołanie do OECD 211 przy jednoczesnym zastosowaniu procedury charakterystycznej dla testu krótkoterminowego 24/48 h) wskazuje na brak precyzji w doborze i opisie metod badawczych. Ma to istotne znaczenie dla interpretacji uzyskanych wyników.

s. VIII (Abstract) – Sformułowanie wniosku o „bezpieczeństwie środowiskowym” próbek po procesie oczyszczania ma charakter zbyt kategoriowy. Redukcja toksyczności w testach krótkoterminowych nie jest równoznaczna z pełnym bezpieczeństwem środowiskowym, szczególnie w kontekście braku analizy produktów transformacji oraz efektów długoterminowych.

s. 168 – Interpretacja spadku efektywności procesu w układzie bioreaktorowym („decrease likely indicates...”) ma charakter spekulatywny i nie jest poparta dodatkowymi pomiarami (np. zmian parametrów fizykochemicznych, aktywności enzymatycznej czy składu produktów reakcji). Wnioski w tym zakresie powinny zostać wyraźnie oznaczone jako hipotezy wymagające dalszej weryfikacji.

W związku z przedstawionymi w recenzji uwagami, uprzejmie proszę Autorkę o odniesienie się do poniższych kwestii w trakcie publicznej obrony rozprawy:

1. Rozróżnienie dekoloryzacji i degradacji barwników

Proszę o jednoznaczne wyjaśnienie, w jaki sposób Autorka rozróżnia proces dekoloryzacji od rzeczywistej degradacji, a w szczególności mineralizacji barwników. Jakie przesłanki – poza pomiarem absorbancji UV-Vis – pozwalają na wnioskowanie o rzeczywistym rozkładzie związków chemicznych? Czy Autorka rozważyła zastosowanie dodatkowych metod analitycznych (np. oznaczeń TOC/COD, identyfikacji produktów reakcji), które mogłyby potwierdzić charakter zachodzących przemian?

2. Kryteria analizy danych transkryptomicznych

Proszę o doprecyzowanie, czy w analizach RNA-seq zastosowano korektę wielokrotnego testowania (np. FDR/Benjamini–Hochberg). W przypadku jej braku – w jaki sposób Autorka ocenia wpływ zastosowania nieskorygowanych wartości p („raw p-value < 0.05”) na wiarygodność identyfikacji genów różnicowo ekspresowanych? Jak zmieniłaby się interpretacja wyników po uwzględnieniu takiej korekty?

3. Interpretacja wyników proteomicznych

W związku z brakiem replik biologicznych w analizach proteomicznych proszę o wskazanie, które z przedstawionych wniosków odnośnie mechanizmu procesu Autorka uważa za najbardziej wiarygodne, a które należy traktować wyłącznie jako hipotezy badawcze. W jaki sposób Autorka uzasadnia możliwość formułowania wniosków odnoszących się do mechanizmów degradacji przy ograniczonej analizie statystycznej danych?

4. Ograniczenia metody desorpcji w ocenie mechanizmów procesu

Proszę o omówienie ograniczeń zastosowanej metody desorpcji w 70% roztworze metanolu jako narzędzia rozróżniania biosorpcji i biodegradacji. W jaki sposób Autorka wyklucza wpływ rozpuszczalnika na strukturę biomasy oraz obecność produktów pośrednich? Czy możliwe jest zastosowanie bardziej jednoznacznych metod oceny udziału poszczególnych mechanizmów?

5. Zastosowane podejście statystyczne

Proszę o uzasadnienie zastosowania testów jednostronnych w analizie danych eksperymentalnych. Jakie były hipotezy kierunkowe uzasadniające ich użycie? Czy przeprowadzono weryfikację podstawowych założeń testów statystycznych (normalność rozkładu, jednorodność wariancji)?

6. Interpretacja wyników ekotoksykologicznych

Proszę o doprecyzowanie, na jakiej podstawie Autorka formułuje wniosek o „bezpieczeństwie środowiskowym” próbek po procesie oczyszczania. W jaki sposób Autorka odnosi wyniki testów krótkoterminowych do potencjalnych efektów długoterminowych, w tym możliwości bioakumulacji oraz wpływu produktów transformacji na organizmy żywe?

7. Spójność metodologiczna w zakresie standardów ekotoksykologicznych

Proszę o wyjaśnienie rozbieżności pomiędzy przywoływanymi standardami badawczymi (np. OECD 211) a rzeczywiście zastosowaną procedurą eksperymentalną (test 24/48 h). Jak Autorka ocenia wpływ tej niespójności na interpretację wyników?

8. Możliwość zastosowania wyników w warunkach rzeczywistych

Proszę o ocenę możliwości przeniesienia uzyskanych wyników do warunków rzeczywistych oczyszczalni ścieków. Jak Autorka ocenia wpływ obecności naturalnej

mikroflory, zmienności składu ścieków oraz obecności innych zanieczyszczeń na efektywność procesu?

9. Funkcjonowanie układu w skali bioreaktorowej

Proszę o rozwinięcie interpretacji wyników uzyskanych w badaniach bioreaktorowych, w szczególności przyczyn obserwowanego spadku efektywności procesu w kolejnych cyklach. Jakie dodatkowe pomiary należałoby wykonać, aby jednoznacznie potwierdzić proponowane wyjaśnienia?

10. Kierunki dalszych badań

W kontekście przedstawionych ograniczeń metodologicznych proszę o wskazanie, jakie działania badawcze Autorka uznaje za kluczowe dla dalszego rozwoju przedstawionej koncepcji, w szczególności w zakresie potwierdzenia mechanizmów biodegradacji oraz zwiększenia aplikacyjności zaproponowanego rozwiązania.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Ruchi Manishkumar Upadhyay pt.: *“Determination of the mechanism and optimization of the conditions of the process of removing colored aromatic compounds by selected Basidiomycota”* spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z późn. zm.) dla kandydatów ubiegających się o nadanie stopnia naukowego doktora. Rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a Doktorantka wykazała się odpowiednią wiedzą teoretyczną w dyscyplinie inżynieria środowiska oraz umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Pomimo wskazanych w recenzji uwag krytycznych, praca wnosi istotny wkład do rozwoju wiedzy w zakresie biotechnologicznych metod usuwania zanieczyszczeń ze środowiska wodnego. Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka o dopuszczenie mgr Ruchi Manishkumar Upadhyay do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk inżynieryjno-technicznych w dyscyplinie inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka.

Dr hab. inż. Ewa Wiśniowska, prof. PCz.