



Rzeszów, dn. 10 kwietnia 2026 r.

dr hab. inż. Łukasz Jurczyk, prof. UR
Uniwersytet Rzeszowski
Wydział Technologiczno-Przyrodniczy
Instytut Nauk Rolniczych, Ochrony i Kształtowania Środowiska
ul. Ćwiklińskiej 1A, 35-601 Rzeszów
tel. 17 872 17 25, e-mail: ljurczyk@ur.edu.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej M.Sc. Ruchi Manishkumar Upadhyay

pt. „*Determination of the mechanism and optimization of the conditions of the process of removing colored aromatic compounds by selected Basidiomycota*”

1. Przedmiot i podstawa formalna opracowania recenzji

Przedmiotem recenzji jest rozprawa doktorska pt. „*Determination of the mechanism and optimization of the conditions of the process of removing colored aromatic compounds by selected Basidiomycota*”, której autorem jest M.Sc. Ruchi Manishkumar Upadhyay, a promotorem prof. dr hab. inż. Wioletta Przysaś.

Podstawę formalną przygotowania recenzji stanowi uchwała Rady Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka na Wydziale Inżynierii Środowiska i Energetyki, Politechniki Śląskiej z dnia 19.02.2026 r., oraz skierowane do mnie pismo przewodnie (RIE-BD.512.14.2026) Przewodniczącego Rady, Pana prof. dr hab. Krzysztofa Labusa, z dnia 03 marca 2026 r., które odebrano, wraz z pracą w wersji drukowanej, w kancelarii Uniwersytetu Rzeszowskiego dnia 12.03.2026 r.

2. Uzasadnienie podjęcia tematu – opis tez, celów i zakresu pracy

W rozdziale 3. *Research statement* (str. 19) autorka, na podstawie poprzedzającego go przeglądu literatury, wysunęła twierdzenie, że stosowane obecnie metody usuwania syntetycznych barwników ze ścieków przemysłowych są niewystarczające. Według niej skutecznym rozwiązaniem byłoby wprowadzenie zdecentralizowanych, kompaktowych i szybkich systemów oczyszczania, które mogłyby funkcjonować bezpośrednio u źródła powstawania zanieczyszczeń. Tego typu systemy mogłyby być oparte o reaktory biologiczne zawierające biomasę grzybów *Basidiomycota*, co stanowiłoby zrównoważoną alternatywę

dla innych metod oczyszczania. W kontekście powyższego zidentyfikowała **pięć obszarów** wiedzy, w obrębie których istnieją niedobory o kluczowym znaczeniu dla funkcjonowania tego typu technologii; (1) po pierwsze **niedostateczne rozpoznanie na poziomie molekularnym i biochemicznym mechanizmów usuwania zanieczyszczeń przez grzyby na drodze biosorpcji i biodegradacji**, (2) następnie **brak kompleksowych badań nad optymalizacją parametrów technologicznych** dla różnych gatunków grzybów, w celu zwiększenia efektywności oczyszczania, (3) kolejny to **ograniczone podejście multiomiczne** w dotychczasowych pracach badawczych, które pozwoliłoby na pełniejsze zrozumienie szlaków metabolicznych zaangażowanych w degradację poszczególnych barwników, (4) kolejny, to brak wystarczającej **oceny toksyczności produktów oczyszczania**, zwłaszcza z użyciem standaryzowanych testów, (5) wreszcie jako ostatni wymienia brak przełożenia dotychczasowych wyników badań w skali laboratoryjnej **na systemy inżynieryjne oczyszczania barwników syntetycznych w skali właściwej dla decentralizacji**. Na tej podstawie autorka postawiła następującą hipotezę badawczą - *grzyby białej zgnilizny, takie jak T. versicolor i P. ostreatus wykazują zdolności usuwania barwników poprzez synergiczny mechanizm biosorpcji i biodegradacji enzymatycznej, który można znacząco poprawić poprzez optymalizację kluczowych parametrów fizykochemicznych i skutecznie zastosować w kompaktowych, zdecentralizowanych systemach bioreaktorów zaprojektowanych dla określonych barwników. Oczyszczanie może prowadzić do redukcji toksyczności odpływów, zaś podejście multiomiczne może pomóc w zrozumieniu związku między aktywnością enzymów a ekspresją genów, co może stanowić podstawę do modelowania interakcji między tymi enzymami, a różnymi klasami barwników.*

Dalej autorka wskazała jaki **zakres badań** (Fig. 2) jest konieczny w celu potwierdzenia tej hipotezy, koncentrując się na trzech obszarach: (1) **optymalizacji procesu oczyszczania** (w tym doboru gatunków, sposobu wykorzystania ich biomasy i optymalizacji kluczowych parametrów technologicznych z zastosowaniem zaawansowanych narzędzi statystyki i modelowania), **identyfikacji mechanizmów degradacji** (z użyciem podejścia multiomicznego) oraz **redukcji toksyczności** (potwierdzone przez badania na wybranych organizmach modelowych). W konsekwencji Pani Ruchi Manishkumar Upadhyay sformułowała w swojej pracy w sposób systematyczny szereg uszczegółowionych **celów badawczych** - są to kolejno: (1) **Optymalizacja parametrów biodegradacji**, w szczególności parametrów fizykochemicznych, roli immobilizacji, stężenia biomasy i barwnika, czasu ekspozycji, wytrząsania, źródeł węgla i azotu oraz warunków oświetlenia, (2) **optymalizacja parametrów biosorpcji**, w szczególności parametrów fizykochemicznych, wpływu immobilizacji, stanu biomasy, wytrząsania, stężenia barwnika, czasu ekspozycji, pH i temperatury,

(3) *analiza multiomiczna, w szczególności, analiza tkranskryptomu, proteomu i profilu enzymów, (4) Ocena mechanizmu usuwania barwników, w szczególności ocena udziału degradacji i sorpcji, analiza grup funkcyjnych biosorbentu, wywnioskowanie mechanizmu usuwania barwnika w oparciu o Ontologię Genów (GO), (5) Ocena ekotoksykologiczna, a w szczególności kompleksowa ocena wpływu produktów oczyszczania na bezpieczeństwo środowiska, ustalenie różnic zootoksyczności wobec D. magna oraz fitotoksyczności wobec Spirodela polyrhiza barwników czystych i po procesie oczyszczania oraz (6) koncepcja projektu bioreaktora; opracowanie założeń bioreaktora w oparciu o zoptymalizowane parametry.*

Doktorantka uzasadniła głęboko we wstępie i przeglądzie literatury skalę problemu jaki skłonił ją do podjęcia tematyki pracy. Obecna globalizacja gospodarki powoduje, że ciężar produkcji tekstyliów przeniósł się już dawno w rejon południowej i wschodniej Azji. Trzeba jednak podkreślić, że to m.in. kraje UE są jednym z głównych ich konsumentów, przenosząc niejako konsekwencje zanieczyszczenia środowiska poza swój obszar, ale również odpowiedzialność i kontrolę. Jednocześnie w tamtym obszarze kulturowym znaczenie barwników wybiega daleko poza estetykę, ale dotyczy też tradycji, wierzeń i tożsamości, a historia ich stosowania w barwieniu tkanin sięga co najmniej kilku tysięcy lat.

Realizacja postawionych w pracy zadań badawczych stanowiła ambitny cel i wymagała przede wszystkim rozbudowanej metodyki badań, rozciągającej się na wiele dziedzin i angażującej specjalistyczne techniki analityczne, obejmującej konsekwentnie przemyślane i systematycznie realizowane eksperymenty prowadzące do uzyskania szerokiego spektrum i znacznych ilości danych do obróbki statystycznej.

3. Ogólna charakterystyka rozprawy doktorskiej – układ oraz zawartość pracy

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska M.Sc. Ruchi Manishkumar Upadhyay, przygotowana została jako jednolita rozprawa napisana w języku angielskim, licząca w sumie, wraz z elementami formalnymi i załącznikami - 204 strony. Praca ma standardowy układ dla monografii naukowej odpowiadający dysertacji doktorskiej w dziedzinie nauk inżyniersko-technicznych, opartej o dane empiryczne; z klarownym podziałem na część teoretyczną, prowadzącą sformułowania hipotez badawczych i celu (łącznie 23 strony), oraz część empiryczną (łącznie 150 stron), opisującą sposób osiągnięcia wyników oraz ich omówienie dyskusję, zakończoną wnioskami oraz perspektywami dalszych badań.

Tekst pracy został wzbogacony o 63 barwnych grafik w części głównej (oraz z dodatkowe w załącznikach) obejmujących oprócz klasycznych wykresów obrazujących dane naukowe, również schematy blokowe systematyzujące postawione zadania, wykonania poszczególnych

eksperymentów, rysunki struktur chemicznych czy zdjęcia z SEM. Ponadto w pracy znajduje się 19 tabel w części głównej i 5 w *Załącznikach*. Z doświadczenia wiem, że stosowanie barwnych grafik, szczególnie w przypadku wykresów przedstawiających szczegółowe dane, nie zawsze jest dla każdego czytelne. Jednak w tym przypadku koresponduje z tematyką dysertacji, co więcej kolory wydają się nie być wybrane przypadkowo, ale odwzorowywać barwniki opisywane w pracy (co jest widoczne np. na wykresach efektywności dekoloryzacji na stronach 61-67). Ten drobny zabieg działa na wyobraźnię czytelnika. Mimo wszystko wybrane rysunki mogą być mało czytelne z powodu dużej ilości drobnych opisów (np. Fig 43). Na szczególną uwagę zasługuje jednak estetyka pracy i staranna edycja.

Praca poprzedzona jest **częścią formalną**, w której czytelnik znajdzie, po stronie tytułowej, **podziękowania** (*Acknowledgement*), **spis treści** (*Table of contents*) oraz **streszczenie** (*Abstract*) w języku angielskim, na 686 słów (czyli 4769 znaków bez spacji), zakończone jedenastoma słowami kluczowymi (t.j.: *mykoremediacja; grzyby powodujące białą zgniliznę* [dop.: w wersji polskiej być może powinno być po prostu - grzyby białej zgnilizny]; *barwniki syntetyczne; biodegradacja; biosorpcja; transkryptomika; proteomika; ekotoksykologia; oczyszczanie ścieków; Trametes versicolor; Pleurotus ostreatus*), a na kolejnej stronie jego tłumaczenie w języku polskim. Streszczenie jest dość rozległe, co jednak należy tłumaczyć dużą ilością wątków jakie poruszono w pracy, ale co najważniejsze dobrze opracowane i czytelne. Na stronie XII znajduje się lista czterech publikacji z lat 2022-2025, o łącznym IF=7,7 i 340 punktach z wykazu MNiSW, opublikowanych przez autorkę wspólnie z promotorem. We wszystkich tych publikacjach, dotyczących tematyki opisywanej w dysertacji, Pani Ruchi Upadhyay jest pierwszym autorem, co podkreśla dojrzałą rolę promotora, którego zadaniem jest wspieranie planu badań i dzielenie się doświadczeniem w przygotowaniu publikacji, w których główna rola przypada doktorantowi. Tego typu badania nie mogły być zrealizowane bez zabezpieczenia wystarczających środków finansowych, w tym przypadku czterech projektów finansowanych przez Wydział Energetyki i Inżynierii Środowiska Politechniki Śląskiej. Część formalną kończy lista 33 akronimów używanych w pracy. Nie są to wszystkie skrótowce, które można znaleźć w treści, jednak rzeczywiście najczęściej powtarzające się, np. nazwy wariantów badawczych czy barwników.

Część teoretyczną rozpoczyna krótkie, dwustronicowe **wprowadzenie** do problematyki pracy (*Introduction, str. 1*), w którym autorka zauważa, że istnieje pilna potrzeba opracowania technologii oczyszczania ścieków zawierających różne barwniki, charakteryzujące się odmienną strukturą i własnościami - dlatego odpowiednim podejściem jest decentralizacja systemów oczyszczania, a technologią, którą należy w pierwszej kolejności rozważyć jako potencjalnie najmniej obciążającą środowisko, ale jednocześnie najbardziej elastyczną w projektowaniu

eksperymentów optymalizujących efektywność oczyszczania – wykorzystanie reaktorów biologicznych. Szczególnie obiecujące wydaje się użycie w nich biomasy grzybów tzw. białej zgnilizny. Wprowadzenie wraz z **przeglądem literatury** (str. 3, *Review of literature*) wydaje się krótkie, bo zawiera łącznie tylko 18 stron, na których autorka zdążyła się jednak powołać na 118 pozycji literatury, co świadczy mimo wszystko o zrównoważeniu proporcji między teoretyczną i empiryczną częścią dysertacji. Dodam, że pewną liczbę odniesień do literatury czytelnik znajdzie również w metodyce badań. Doktorantka zaczyna od zdefiniowania pojęcia barwników, i krótko odnosi się do ich znaczenia kulturowego i historii ich stosowania. Następnie w kilku zdaniach podkreśla pozytywne własności barwników naturalnych stawiając je niejako w opozycji opisywanych kolejno barwników syntetycznych, na których się koncentruje przechodząc do ich klasyfikacji w oparciu o: strukturę chemiczną i sposób stosowania, niekorzystne oddziaływanie na ekosystem (głównie wodny) oraz zdrowie i życie człowieka – co koresponduje, według doktorantki, z co najmniej kilkoma celami zrównoważonego rozwoju wskazywanymi przez Narody Zjednoczone. Następnie scharakteryzowany został skład ścieków zawierających barwniki, szczególnie w kontekście średnich zawartości i limitów dopuszczalnych przez prawo w wybranych krajach. W kolejnym podrozdziale (str. 10, 2.6) autorka przechodzi do szczegółowej charakterystyki metod oczyszczania ścieków zawierających barwniki; najpierw metod fizycznych (adsorpcji i technik membranowych), chemicznych (tu wymienia koagulację, elektrokoagulację, procesy głębokiego utleniania oraz fotokatalizę) i wreszcie biologicznych z użyciem biomasy bakterii, glonów, drożdży i grzybów strzępkowych. Stąd przechodzi już do szczegółowego omówienia potencjału biodegradacji barwników przez grzyby białej zgnilizny (podrozdział 2.7, str. 14). Omawia krótko taksonomię gatunków degradujących w naturze ligninę i wykorzystywany przez nie mechanizm enzymatyczny. Następnie przedstawia spektrum substancji chemicznych mogących również ulegać biodegradacji przez te gatunki – m.in. środków ochrony roślin, metali ciężkich, antybiotyków i leków przeciwzapalnych czy hormonalnych, ale również WWA (PAHs), PCB, a wreszcie barwników. Te ostatnie usuwane są na drodze biosorpcji, bioakumulacji i enzymatycznej biodegradacji – jak jednak podkreśla doktorantka „pełny mechanizm leżący u podstaw mikoremediacji nie jest dobrze znany”.

Dalej omówione są sposoby immobilizacji enzymów (ich zalety i wady zestawiono w formie tabeli), potencjał martwej i żywej biomasy grzybów do sorpcji barwników, autorka wymienia również materiały mogące służyć jako potencjalne nośniki biomasy, a wreszcie przechodzi do zalet multiomiki w analizie grzybów. Doktorantka konstatuje, że niewystarczające zrozumienie kompleksowych mechanizmów rządzących rozkładem szkodliwych barwników tekstylnych może ograniczać zastosowanie metod biologicznych. Zintegrowane podejście do tego problemu mają umożliwiać nowe narzędzia multiomiczne. W dalszej części przeglądu literatury autorka

przechodzi do omówienia zagadnień związanych z toksykologią produktów oczyszczania - zauważa, że *detoksykacja zazwyczaj nie jest tym samym co dekoloryzacja*, a produkty rozkładu mogą powodować potencjalnie większe ryzyko środowiskowe, niż pierwotny barwnik - dlatego konieczne jest ocena toksyczności odpływów z systemu oczyszczania za pomocą baterii testów reprezentujących różne poziomy troficzne. W podsumowaniu tego rozdziału wylicza niekorzystne czynniki, które utrudniają implementacje technologii bioreaktorów z biomasą grzybów i wskazuje na konieczne do uzupełnienia luki w wiedzy pozwalające je pokonać.

Rozdział **Research Statement** omówiono wyżej, w opisie **tez, celów i zakresu pracy**.

Materiały i metody (str. 24) są bardzo rozbudowane zarówno pod względem objętości (35 stron), jak i struktury - naliczyłem tutaj aż 47 podrozdziałów (!). Rozdział ten jest też bogato ilustrowany grafikami przedstawiającymi schematy poszczególnych wariantów badań. W pierwszej części autorka charakteryzuje dobór związków chemicznych wybranych do badań, reprezentujących po dwa barwniki azowe (*Czerwień kongo - CR* i *Błękit Evansa - EB*) i trifenylometanowe (*Zieleń brylantowa - BG* i *Fiolet krystaliczny - CV*) oraz jeden antrachinonowy (*Błękit brylantowy Remazol R - RBBR*), i sposób przygotowanie ich roztworów używanych w dalszych eksperymentach. Następnie przechodzi do wyboru, przygotowania i warunków hodowli szczepów grzybni - boczniaka ostrygowatego *Pleurotus ostreatus* (szczep BWPH) oraz wrośniaka różnobarwnego *Trametes versicolor* (CB8).

Jako nośniki biomasy doktorantka wybrała materiały ogólnodostępne w handlu detalicznym jako myjki z PP i gąbki PU. Moim zdaniem, dalej w pracy powinno się używać nieco innych określeń, do czego odnoszę się w uwagach poniżej.

Biomasa w dalszych eksperymentach występuje w postaci wolnej, agregatów grzybni (*self-immobilised, mycelial pellets*) oraz immobilizowanej na PP i PU, ta ostatnia również w formie nieżywej (autoklawowana) i w zależności od wariantu jest hodowana w warunkach statycznych lub wytrząsana. Ten układ badawczy wymagał zastosowania rozbudowania wariantów próbek kontrolnych (fig. 10, str. 32). W celu optymalizacji procesu biodegradacji barwników badano wpływ takich warunków technologicznych jak wytrząsanie, źródło węgla i azotu w medium hodowlanym, sposób immobilizacji biomasy oraz ekspozycję na mieszaninę barwników.

W mojej ocenie ocena aktywności biologicznej na kolejnych poziomach organizacji komórki w układzie technologicznym oczyszczającym barwniki stanowi najważniejszy aspekt poznawczy pracy. Po pierwsze opisano sposób izolacji i oceny aktywności głównych enzymów potencjalnie zaangażowanych w rozkład trzech wybranych (RBBR, EB i CV) barwników - lakazy (Lacc) oraz peroksydaz manganowej (MnP) i ligninowej (LiP). Do analizy transkryptomu wybrano bardziej obiecujący po wstępnych badaniach szczep *T. versicolor* i dwa barwniki (RBBR i EB) jako czynniki różnicujące ekspresję genetyczną. Ekstrakcji oraz sprawdzenia jakości i ilości RNA

ogólnego dokonano na PŚ, natomiast otrzymane izolaty zostały przesłane do komercyjnego podwykonawcy w celu przygotowania bibliotek i sekwencjonowania. Autorka dysertacji zna i przedstawia jednak jej kolejne etapy – doczyszczanie, fragmentację, odwrotną transkrypcję, ligację i PCR. Szczegółowo opisuje też obróbkę bioinformatyczną uzyskanych z RNAseq danych. Do analiz ontologii genów wybrano geny o zmianie ekspresji ≥ 2 , a porównania prób eksponowanych na barwniki z próbami kontrolnymi oparto o dane z banku genów NCBI.

Kolejnym zestawem danych koniecznym do podejścia multiomicznego była analiza proteomu *T. versicolor*, który został wybrany ze względu na najwyższą skuteczność w degradacji barwników RBBR, EB i CV. Po siedmiodniowej hodowli i 48-godzinnej ekspozycji na barwniki przeprowadzono trój etapową analizę proteomiczną (ekstrakcja białek, LC-MS, analiza bioinformatyczna danych), aby zidentyfikować różnice w profilu białek w odpowiedzi barwniki.

Następnym etapem pracy była ocena ekotoksyczności produktów oczyszczania barwników, oparta o standaryzowane testy zootoksyczności na *D. magna* oraz fitotoksyczności na *Spirodela polyrhiza* (Lemnoideae). Ciekawym eksperymentem było określenie wpływu światła o różnych długościach fali; białego, czerwonego, niebieskiego i zielonego na degradację barwników RBBR i EB przez oba gatunki grzybów białej zgnilizny. Następny etap badań miał z kolei na celu określenie, w jakim stopniu sama biomasa grzybowa — poprzez adsorpcję powierzchniową, absorpcję i akumulację wewnątrzkomórkową — usuwa barwniki niezależnie od działania enzymów zewnątrzkomórkowych. Przygotowano dwa typy biosorbentów, w formie agregatów grzybni oraz immobilizowane na nośniku, odplukując enzymy z 7-dniowej biomasy. Testowano zarówno biosorbenty żywe, jak i martwe (autoklawowane).

Sprawdzano również wpływ początkowego stężenia barwnika (100–400 mg/L) oraz czasu kontaktu na efektywność biosorpcji przez żywe biosorbenty czterech wariantów. Absorbancję supernatantu mierzono po 0, 1, 2, 4, 6 i 24 godzinach, aby określić tempo i wydajność usuwania barwnika. Dane z obu parametrów analizowano z pomocą analizy PCA, aby zidentyfikować ich łączny wpływ na proces biosorpcji. Analizując wpływ dwóch kluczowych parametrów (temperatury i pH) w celu optymalizacji biosorpcji zastosowano również inne metody statystyczne; Central Composite Design (CCD) oraz metodologię powierzchni odpowiedzi (RSM) - aby opracować równanie opisujące zależności między zmiennymi niezależnymi, a odpowiedzią układu. Oceniano również możliwości wielokrotnej sorpcji-desorpcji biomasy.

W poprzednich testach laboratoryjnych wykazano, że agregaty grzybni oraz unieruchomiona na gąbce biomasa *T. versicolor* najszybciej i najskuteczniej usuwała barwnik RBBR, dlatego wybrano je do dalszych testów w bioreaktorach laboratoryjnych, w których przeprowadzono cztery kolejne cykle dodawania barwnika, wykorzystując wcześniej przygotowaną immobilizowaną biomasę. Po 7-dniowym etapie wzrostu do dwóch bioreaktorów oraz do

kontroli abiotycznych wprowadzono RBBR, prowadząc cztery, 5-dniowe cykle dodawania barwnika. Po każdej dawce pobierano próbki w celu określenia stężenia początkowego, a po 48 godzinach oceniano skuteczność odbarwiania i obliczając procent usunięcia barwnika względem kontroli.

Najobszerniejszą częścią pracy jest zawarty aż na 110 stronach opis **wyników i dyskusja** (rozdział 5, od str. 59). W pierwszej kolejności Pani Ruchi Upadhyay poddała ocenie wzrost biomasy grzybów, która zachowywała się różnie w zależności od sposobu immobilizacji: gąbka PU zapewniała pełną i równomierną kolonizację, podczas gdy PP były zasiedlane tylko w 30–40%, co wymagało użycia większej ich masy w reaktorze. Agregaty grzybni miały najwyraźniej większą powierzchnię sorpcyjną, co zwiększa efektywność początkowej sorpcji barwnika i wpływa na końcową skuteczność degradacji. Biomasa na gąbce PU wykazała znacznie wyższą skuteczność usuwania barwników niż na PP, co wynika według autorki z większej porowatości, hydrofilowości i powierzchni sorpcyjnej nośnika, umożliwiających lepszy transport masy i dyfuzję barwnika. W obu nośnikach efektywność rosła wraz ze stężeniem barwnika, po czym stabilizowała się wskutek wysycenia, przy czym gąbka PU utrzymywała wysoką skuteczność w szerszym zakresie stężeń. Oba badane gatunki wykazały bardzo wysoką zdolność do dekoloryzacji barwników, przy czym szczep CB8 w każdej formie usuwał ponad 90% EB, CV i RBBR we wszystkich badanych stężeniach. Szczep BWPH w formie agregatów i na PU osiągał powyżej 80% efektywności, dlatego do dalszych badań wybrano wyłącznie te dwie formy immobilizacji, pomijając PP ze względu na słabą kolonizację. Szczep CB8 w formie agregatów grzybni i immobilizowany, utrzymywał bardzo wysoką skuteczność usuwania EB (95–99%) we wszystkich stężeniach, co według autorki wynikało z silnego układu enzymów oksydacyjnych i dobrej tolerancji na stres barwnikowy. Szczep BWPH również efektywnie degradował EB, choć jego wydajność spadała przy wyższych stężeniach, a immobilizacja na gąbce wyraźnie poprawiała stabilność i odporność na toksyczność barwnika. Szczep CB8 w formie agregatów najlepiej usuwał CR, osiągając ponad 90% dekoloryzacji przy wyższych stężeniach, podczas gdy immobilizacja na gąbce obniżała jego skuteczność. BWPH był bardziej podatny na toksyczność barwnika, lecz immobilizacja na gąbce znacząco poprawiała jego wydajność (do 85%), co potwierdza, że nośnik może łagodzić stres wywołany dużym ładunkiem barwnika. Eksperymenty z desorpcją potwierdziły, że sorpcja odgrywa istotną rolę w procesie dekoloryzacji, a jej udział zależy zarówno od rodzaju nośnika, jak i właściwości barwnika. Biomasa na nośniku PU wykazała wysoką zdolność sorpcji–desorpcji, podczas gdy PP charakteryzował się minimalną desorpcją, co wynika z jego hydrofobowości i braku aktywnych miejsc wiążących. Najwyższą desorpcję obserwowano dla EB i CV, przy czym wolna biomasa grzybowa obu szczepów uwalniała znacznie więcej barwnika niż biomasa immobilizowana,

co wskazuje na większy udział fizycznej sorpcji w tych układach. Immobilizacja – zwłaszcza na gąbce – prowadziła do trwalszego wiązania barwnika i mniejszej desorpcji, co według autorki sugeruje dominację procesów chemisorpcji i biodegradacji oraz stabilniejszą interakcję barwnik–biomasa–nośnik.

T. versicolor skuteczniej niż *P. ostreatus* usuwał RBBR, wytrząsanie dodatkowo wzmacniało jego aktywność enzymatyczną, umożliwiając szybkie (>90% w 24 h) utlenianie barwnika. W przypadku EB oba szczepy osiągały wysoką dekoloryzację, a różnice między warunkami statycznymi i dynamicznymi były niewielkie, co według doktorantki wskazuje, że degradacja barwników azo zależy mniej od natlenienia niż rozkład barwników antrachinonowych.

Zewnętrzne źródło węgla wyraźnie modulowało zdolność grzybów do degradacji barwników (str. 76): *T. versicolor* osiągał najwyższą skuteczność, zwłaszcza po hodowli w warunkach wytrząsania, co miało wynikać z lepszego natlenienia i silniejszej indukcji enzymów ligninolitycznych, natomiast *P. ostreatus* również dekoloryzował barwniki, lecz znacznie słabiej, a wpływ sacharozy jako źródła węgla nie poprawiał efektywności w porównaniu z podłożem standardowym, podkreślając znaczenie zarówno warunków tlenowych i dostępności dobranych składników odżywczych dla aktywności enzymatycznej. Podwojenie stężenia glukozy ujawniło, że zbyt wysoki poziom łatwo przyswajalnego węgla osłabia aktywność enzymów ligninolitycznych, co skutkuje niższą efektywnością dekoloryzacji w porównaniu z podłożem o standardowej zawartości glukozy. Najlepsze wyniki nadal uzyskiwał *T. versicolor* (CB8), zwłaszcza w warunkach wytrząsania, natomiast *P. ostreatus* (BWPH) reagował na zwiększone stężenie nieco lepiej w warunkach statycznych, co potwierdza, że optymalne (a nie maksymalne) stężenie glukozy sprzyja produkcji enzymów odpowiedzialnych za degradację barwników. Doktorantka udowodniła więc, że skuteczność dekoloryzacji przez grzyby białej zgnilizny silnie zależy od stężenia zewnętrznego źródła węgla oraz optymalnych warunków wzrostu, a najlepsze efekty uzyskuje się przy umiarkowanej dostępności węgla i dobrej aeracji. Nadmiar węgla prowadził do recesji katabolicznej (CCR), która ogranicza syntezę enzymów ligninolitycznych, dlatego optymalizacja źródeł węgla i warunków tlenowych jest kluczowa dla maksymalizacji efektywności usuwania barwników.

Ograniczona i nadmierna dostępność azotu wyraźnie modulowała aktywność enzymatyczną grzybów białej zgnilizny: najwyższą skuteczność dekoloryzacji wszystkich barwników uzyskano w warunkach niedoboru azotu, podczas gdy media bogate w azot, zwłaszcza nieorganiczny, silnie hamowały degradację. Wyniki jednoznacznie potwierdzają klasyczny mechanizm regulacji u grzybów białej zgnilizny, w którym niskie stężenie azotu indukuje syntezę enzymów ligninolitycznych, a ich nadmiar prowadzi do zahamowania szlaków oksydacyjnych, co czyni optymalizację źródeł azotu kluczowym zagadnieniem technologicznym. Analiza wariacji

jednoznacznie potwierdziła (str. 85), że źródło azotu było najsilniejszym czynnikiem determinującym efektywność dekoloryzacji, następnie gatunek grzyba, a dopiero na końcu źródło węgla, co odzwierciedla kluczową rolę regulacji metabolicznej w szlakach ligninolitycznych. Test *post-hoc* Tukey'a wykazał, że najwyższą skuteczność usuwania RBBR osiągał *T. versicolor* immobilizowany na gąbce w podłożu RM, a immobilizacja i napowietrzanie dodatkowo wzmacniały wydajność, szczególnie u *P. ostreatus*, potwierdzając znaczenie doboru gatunku, nośnika i składu medium dla optymalnej dekoloryzacji. Immobilizacja obu gatunków wyraźnie zwiększała skuteczność degradacji barwników, przewyższając zarówno kultury statyczne, jak i hodowane w warunkach wytrząsania, co potwierdza zdaniem autorki, że struktura nośnika PU tworzy stabilne środowisko sprzyjające wysokiej aktywności enzymatycznej i trwałej biodegradacji barwników. Aktywność Lacc (str. 89) była wyraźnie indukowana przez wszystkie trzy barwniki, a jej poziom zależał od gatunku grzyba, rodzaju barwnika i warunków wzrostu. Najsilniejszą odpowiedź enzymatyczną generował *T. versicolor*, zwłaszcza w kulturach immobilizowanych, co bezpośrednio przekładało się na najwyższą skuteczność degradacji RBBR i EB. *P. ostreatus* reagował słabiej, choć wykazywał podobny trend, zależny od warunków tlenowych i obecności barwnika. Autorka stwierdziła, że immobilizacja i dobre natlenienie silnie wzmacniają produkcję lakazy, która pozostaje kluczowym czynnikiem w degradacji barwników przez grzyby białej zgnilizny. Z kolei aktywność MnP silnie zależała od warunków wzrostu i obecności barwników, przy czym najwyższe poziomy uzyskiwał *T. versicolor* w kulturach wytrząsanych, a najniższe w statycznych. RBBR i EB najsilniej indukowały wczesną produkcję MnP, co dobrze korelowało z szybkim tempem ich dekoloryzacji. *P. ostreatus* wykazywał ogólnie niską aktywność MnP, z wyjątkiem immobilizowanych kultur traktowanych CV. Wyniki potwierdzają, że wysoka aktywność MnP, szczególnie w połączeniu z Lacc, jest kluczowa dla skutecznej degradacji barwników, zwłaszcza w warunkach zapewniających dobre natlenienie i stabilność metaboliczną. Aktywność LiP u *T. versicolor* i *P. ostreatus* zależała od obecności barwników, czasu inkubacji i sposobu hodowli. RBBR wywoływał szybki i intensywny wzrost aktywności u CB8 (szczególnie w warunkach statycznych), podczas gdy BWPH reagował wolniej, ale bardziej stabilnie; wzorce te dobrze korelowały ze skutecznością odbarwiania. W przypadku EB obserwowano opóźnioną indukcję LiP oraz stopniowy wzrost aktywności u BWPH, co również odpowiadało późniejszemu zwiększeniu efektywności degradacji barwnika. Aktywność enzymów ligninolitycznych nie korelowała istotnie z odbarwianiem CV. Według doktorantki wyniki wskazują, że sama aktywność enzymów zewnątrzkomórkowych nie wyjaśnia w pełni efektywności dekoloryzacji, ponieważ istotną rolę odgrywają także procesy nieenzymatyczne i wewnątrzkomórkowe.

Konieczne są zatem podejścia systemowe, takie jak analizy transkryptomyczne i proteomiczne, aby dokładniej zrozumieć mechanizmy degradacji barwników przez grzyby.

Sekwencjonowanie transkryptomu *T. versicolor* (CB8) pozwoliło uzyskać wysokiej jakości, jednorodne dane dla wszystkich próbek, stanowiące solidną podstawę do analizy różnic w ekspresji genów pod wpływem barwników RBBR i EB (str. 98). Badanie to wypełnia istotną lukę, ponieważ dotychczas brakowało szczegółowych analiz transkryptomycznych dotyczących degradacji tych barwników przez grzyby białej zgnilizny, zwłaszcza w kontekście wewnątrzkomórkowych szlaków detoksykacji. Identyfikacja genów różnicowo ekspresjonowanych umożliwia odkrycie nowych mechanizmów metabolizmu ksenobiotyków oraz potencjalnych genów kluczowych dla efektywnej dekoloryzacji, wykraczając poza klasyczne podejście oparte wyłącznie na enzymach zewnątrzkomórkowych. Satysfakcjonujące poziomy mapowania (fig. 37) potwierdziły, że uzyskano odpowiedni zestaw danych do dalszych analiz, obejmujących identyfikację genów o zróżnicowanej ekspresji, analiza ich ontologii i rozpoznanie szlaków metabolicznych. Po złożeniu transkryptów, rekonstrukcji genów i obliczeniu ich poziomów ekspresji wykazano, że 3 623 geny nie wykazywały różnic pomiędzy próbkami - do dalszych analiz pozostawiono 10 939 genów. Analiza DEGs pomiędzy próbkami grzybni eksponowanej na RBBR oraz EB, a próbkami kontrolnymi, przy zastosowaniu bardziej rygorystycznych warunków ($FC > 2$ oraz $p < 0,05$) pozwoliła zawęzić liczbę zidentyfikowanych genów różnicujących do odpowiednio 1 106 i 1 830. W obu przypadkach dominowała silna regulacja w dół, natomiast w obecności RBBR wykryto 318 genów wykazujących nadekspresję, co w opinii autorki wskazuje na wyraźnie odmienną i intensywną odpowiedź transkrypcyjną *T. versicolor* na oba barwniki. Histogramy ekspresji (fig. 39) potwierdzają, że w warunkach stresu barwnikowego dochodzi do przesunięcia całego transkryptomu w kierunku wyższych poziomów ekspresji, szczególnie w zakresie genów o umiarkowanej aktywności. Autorka konstatuje, że grzyb aktywuje rozbudowane sieci metaboliczne, detoksykacyjne i stresowe, przy czym charakter odpowiedzi zależy od struktury chemicznej barwnika, odzwierciedlając odmiennie strategie degradacji. Na podstawie tych wyników doktorantka wybrała zestaw najsilniej indukowanych i represjonowanych genów, które poddano analizie ontologii (str. 108, 5.6.4) w trzech kategoriach: funkcji molekularnych, procesów biologicznych i komponentów komórkowych. W warunkach ekspozycji na RBBR zaobserwowano silną nadekspresję genów kodujących enzymy oksydacyjne (zwłaszcza CYP450), które jak uważa doktorantka, inicjują pierwszy etap ataku na strukturę antrachinonową barwnika, oraz liczne oksydoreduktazy i dehydrogenazy uczestniczące w detoksykacji reaktywnych pośrednich metabolitów. Równocześnie wzrost ekspresji genów związanych z glutationozależną detoksykacją (GST) oraz transporterami wskazuje na aktywację skoordynowanych szlaków fazy II i III metabolizmu

ksenobiotyków (neutralizację i usuwanie produktów). Dodatkowa regulacja w górę genów szlaku szikimowego i enzymów mitochondrialnych sugeruje metaboliczne przeprogramowanie grzyba w kierunku zwiększonej produkcji prekursorów redoks i energii, niezbędnych do utrzymania homeostazy podczas intensywnego stresu oksydacyjnego. Analiza transkryptomyczna *T. versicolor* podczas degradacji EB ujawniła silną indukcję genów związanych z transportem wewnątrzkomórkowym, metabolizmem energetycznym i równowagą redoks, w tym wysoką (prawie 1200-krotną!) nadekspresję białek SNARE oraz enzymów mitochondrialnych. Doktorantka zakłada, że wynika to z intensyfikacji ruchu pęcherzykowego i zwiększonego zapotrzebowania energetycznego. Jednocześnie ekspresja wielu genów regulacyjnych i detoksykacyjnych, takich jak GST, uległa zahamowaniu, co sugeruje, że grzyb preferuje szlaki oparte na intensywnych reakcjach oksydacyjno-redukcyjnych oraz transporcie i sekwestracji metabolitów. Dane transkryptomiczne uzupełniła analiza proteomu (str. 121, 5.7), ujawniając zróżnicowaną liczbę białek o zmienionej ekspresji w zależności od rodzaju barwnika, przy czym RBBR wywoływał najsilniejszą aktywację, a EB największą represję procesów niezwiązanych bezpośrednio z degradacją. To, według doktorantki, zdaje się potwierdzać, że grzyb reorganizuje proteom, ograniczając funkcje wzrostowe na rzecz enzymów oksydacyjnych, redoks i transportowych, kluczowych dla degradacji barwnika. Autorka podkreśla również logiczne powiązania między transkryptomem, a proteomem, wskazując na spójną adaptację do stresu po ekspozycji na różne klasy barwników. Dwukierunkowa analiza hierarchiczna skupień ujawniła odmienne profile proteomiczne u *T. versicolor* w zależności od rodzaju barwnika, przy czym RBBR wydaje się wywoływać najbardziej odmienną odpowiedź w porównaniu z kontrolą. Analiza wskazała zespoły wspólnie regulowanych enzymów (oksydoreduktaz, peroksydaz i transporterów), które odpowiadają za kluczowe etapy degradacji barwników, co wskazuje na jednoczesne istnienie konserwowanych odpowiedzi stresowych, ale też specyficznych dla obecności barwnika adaptacji metabolicznych. Autorka sugeruje, że zdolność *T. versicolor* do elastycznego dostosowywania proteomu może być przydatna dla optymalizacji procesów oczyszczania. Analiza proteomiczna *T. versicolor* w warunkach degradacji RBBR ujawniła silną aktywację peroksydaz i lakkaz, co zdaje się potwierdzać dominację zewnątrzkomórkowych mechanizmów oksydacyjnych w rozkładzie barwników antrachinonowych. Jednocześnie proteiny związane z detoksykacją oksydantów były wyraźnie podwyższone, w przeciwieństwie do tego liczne enzymy metabolizmu podstawowego i biosyntezy uległy wyraźnej represji. Całość wyników potwierdza, że *T. versicolor* priorytetowo wykorzystuje wysoko reaktywne szlaki oksydacyjne do efektywnej dekoloryzacji RBBR kosztem procesów metabolicznych związanych z proliferacją. W warunkach degradacji EB *T. versicolor* reagował zmniejszeniem poziomu białek, w tym kluczowych oksydoreduktaz, co przy

jednoczesnej ekspresji genów enzymów redoks i białek związanych z transportem oraz kompartmentalizacją, wskazywać może na głęboką reorganizację metaboliczną i strukturalną. Proponowany przez doktorantkę mechanizm degradacji barwników obejmuje kolejno: zewnątrzkomórkową oksydację struktur azo i antrachinonowych przez lakkazy i peroksydazy, następnie redukcyjno-oksydacyjne przetwarzanie reaktywnych produktów pośrednich wewnątrz komórki przez dehydrogenazy, reduktazy i cytochrom P450, dalej ich detoksykację i kompartmentalizację w aparacie Golgiego oraz w wakuolach, a na końcu eksport rozłożonych metabolitów przez transportery MFS (co przedstawiono na fig. 44). Doktorantka zauważa, że różnice między transkryptomem, a proteomem mogą wynikać głównie z odmiennego czasu pobierania próbek oraz analizowanej przestrzeni biologicznej (komórka vs środowisko), co sprawia, że transkryptom odzwierciedla wczesną odpowiedź adaptacyjną, a proteom – późny, funkcjonalny zestaw enzymów degradacyjnych. Autorka wskazuje, że połączenie obu podejść ujawnia komplementarne etapy reakcji *T. versicolor* na barwniki, wyjaśniając pozorną rozbieżność między poziomem mRNA, a akumulacją enzymów w medium. Podkreśla, że stanowi to pierwszą tak szczegółową analizę multiomiczną degradacji RBBR, EB i CV przez *T. versicolor*, podkreślając nowatorski charakter badań.

Czyste barwniki wykazywały wysoką rosnącą z czasem ekspozycji toksyczność wobec *D. magna* (str.136, 5.8.1), która znacząco malała po dekoloryzacji roztworu przez obu gatunki. *T. versicolor* okazał się szczególnie efektywny w neutralizacji barwników EB i CV, podczas gdy *P. ostreatus* najlepiej redukował toksyczność RBBR. Autorka podkreśla, że w każdym przypadku działanie grzybów obniżało klasyfikację toksyczności o co najmniej jedną kategorię, co świadczy o realnym zwiększeniu bezpieczeństwa środowiskowego. Fitotoksyczność badanych barwników wyraźnie zależała od ich struktury chemicznej oraz zdolności poszczególnych gatunków grzybów do ich detoksykacji. Wyniki jednoznacznie potwierdzają, że grzyby białej zgnilizny są wyjątkowo skutecznymi biokatalizatorami w usuwaniu toksyczności barwników. Doktorantka wykazała, że oba szczepy skutecznie dekoloryzują RBBR i EB niezależnie od warunków świetlnych, co sugeruje, że kluczową rolę w usuwaniu barwników odgrywa już rozwinięta biomasa i aktywny aparat enzymatyczny. Jednocześnie subtelne różnice dla różnych długości promieniowania wskazują, że światło może modulować metabolizm grzybów i stabilizować aktywność enzymów utleniających, co potencjalnie można wykorzystać do optymalizacji.

Badana biomasa wykazywała znacznie wyższą pojemność sorpcyjną i szybszą kinetykę usuwania BG niż większość wcześniej opisanych biosorbentów. co podkreśla jego przewagę aplikacyjną. Wyniki wskazują, że początkowa faza szybkiej sorpcji wynika z intensywnej adsorpcji powierzchniowej i dużej dostępności miejsc wiążących, podczas gdy dalszy spadek tempa jest związany z ich stopniowym nasyceniem. W badaniu wykazano, że warianty

CB8/S2-BS i BWPH/S2-BS charakteryzują się wysoką skutecznością usuwania CV, szczególnie przy niższych stężeniach początkowych, osiągając ponad 60% redukcji w ciągu pierwszych godzin procesu. Zaobserwowane różnice w efektywności sorpcji między CV a BG wynikają głównie z odmiennych mas cząsteczkowych barwników, co wpływa na ich dyfuzję i dostępność miejsc wiążących. Analiza PCA (str. 152, 5.10.4, Fig. 51 i 52) jednoznacznie potwierdziła, że czas kontaktu oraz początkowe stężenie barwnika są kluczowymi czynnikami determinującymi efektywność biosorpcji. Imobilizowane biomasy obu gatunków konsekwentnie wykazywały wyższą skuteczność usuwania BG i CV niż ich forma zawieszona, co wskazuje na korzystny wpływ matrycy nośnika z PU na stabilność i dostępność miejsc aktywnych. W obu gatunkach grzybów imobilizacja zmniejszała wrażliwość na toksyczność barwników oraz poprawiała kinetykę sorpcji, szczególnie w warunkach wysokiego obciążenia barwnikiem. Autorka wyraża przekonanie, że imobilizacja stanowi skalowalne i wydajne rozwiązanie dla oczyszczania ścieków barwnikowych, umożliwiając bardziej przewidywalne i efektywne usuwanie barwników w zróżnicowanych warunkach operacyjnych. Autoklawowana, imobilizowana biomasa *T. versicolor* zachowała zdolność skutecznego usuwania BG i CV, podczas gdy agregaty grzybni całkowicie ją utraciły, co potwierdza kluczową rolę matrycy nośnika PU w stabilizacji inaktywowanego biosorbentu (str. 155). Różnice w strukturze grzybni wynikające z warunków wzrostu; „spłaszczona” warstwa w hodowli statycznej vs. kuliste agregaty (granule) w warunkach wstrząsania wyraźnie determinowały zdolność sorpcyjną biomasy (str. 157), co tłumaczy lepszą efektywność CB8 w usuwaniu BG oraz słabszą skuteczność BWPH wobec CV. Utrzymanie lekko kwaśnego odczynu i umiarkowanej temperatury okazało się kluczowe dla maksymalizacji biosorpcji BG przez grzybnie obu szczepów, ponieważ warunki skrajnie zasadowe lub wysokotemperaturowe znacząco obniżały efektywność poprzez destabilizację powierzchni komórkowej i ograniczenie aktywności enzymatycznej. Charakteryzując dokładniej nano- i mikrostrukturę matrycy grzybni doktorantka ujawniła, z pomocą analizy spektrum FT-IR, udział kluczowych grup funkcyjnych grzybni w procesie biosorpcji, czego dowodem były przesunięcia i spadki intensywności pasm -OH i -NH po związaniu barwników. Dodatkowe zmiany w obszarach odpowiadających drganiom C=O, C-N, C-O oraz sygnaturom aromatycznym potwierdziły obecność oddziaływań jonowych, wodorowych, van der Waalsa i π - π między barwnikami, a biomasą. Imobilizacja na matrycy PU zwiększyła intensywność pasm w zakresach białek i polisacharydów, wskazując na większą dostępność grup funkcyjnych i wyższą zdolność sorpcyjną imobilizowanych wariantów. Obrazy z SEM potwierdziły, że gąbka PU zapewnia wysoce porowatą, trójwymiarową mikrostrukturę sprzyjającą równomiernej kolonizacji grzybów i efektywnej biosorpcji barwników. Zarówno *T. versicolor*, jak i *P. ostreatus* tworzyły stabilne, rozbudowane sieci strzępkowe, które po kontakcie z BG i CV wykazywały

wyraźne zmiany powierzchniowe, takie jak wygładzenie, pokrycie warstwą barwnika czy częściowe zatkanie porów. Porównanie obrazów przed i po sorpcji jednoznacznie potwierdza skuteczne wiązanie barwników oraz wskazuje, że immobilizacja na gąbce sprzyja większej stabilności grzybni jako biosorbentu.

W ostatniej części omówienia wyników (str. 168, 5.11) autorka przedyskutowała eksperyment oczyszczania w bioreaktorach. W skali laboratoryjnej *T. versicolor* wykazał wysoką i trwałą zdolność dekoloryzacji RBBR, w porównaniu z kontrolą abiotyczną. W dwóch pierwszych cyklach zarówno hodowla wstrząsana, jak i biomasa immobilizowana usuwały ponad 90% barwnika (fig. 63), co według niej odzwierciedlało silną aktywność enzymatyczną i brak efektu hamującego kolejnych podawanych w dopływie dawek. Spadek efektywności w trzecim cyklu sugerował stres metaboliczny lub akumulację metabolitów, jednak oba systemy nadal znacząco przewyższały kontrolę. W czwartym cyklu zaobserwowano stabilizację lub częściowe odzyskanie aktywności, a immobilizacja na gąbce zapewniła wydajność porównywalną lub wyższą, szczególnie w początkowych etapach pracy bioreaktora.

W ostatnim rozdziale (*Future prospects of research*, str. 173) doktorantka przedstawia swoją opinię na temat rozwoju badań, m.in.: rozwoju ciągłych, modułowych bioreaktorów z immobilizowaną biomasą, monitorowania procesów za pomocą narzędzi molekularnych, integracji reaktorów z biomasą grzybów z istniejącymi technologiami oczyszczania czy badań nad regeneracją i ponownym wykorzystaniem biomasy immobilizowanej.

Doktorantka podsumowała dysertację 15 wnioskami w formie zwięzłych haseł (*highlights*) z rozwinięciem. Badania potwierdziły, że *T. versicolor* jest wyjątkowo skutecznym, stabilnym i ekologicznym sposobem na usuwanie syntetycznych barwników, a jego wydajność można znacząco zwiększyć poprzez optymalizację parametrów fizykochemicznych oraz immobilizację na tanich nośnikach. Zarówno *T. versicolor*, jak i *P. ostreatus* wykazały szerokie spektrum aktywności wobec różnych klas barwników, wysoką efektywność przy dużych obciążeniach oraz zdolność do pracy w systemach bioreaktorowych. Analizy multiomiczne ujawniły, że kluczową rolę w degradacji odgrywają zintegrowane szlaki detoksykacji wewnątrzkomórkowej, obejmujące m.in. CYP450, oksydoreduktazy i transportery błonowe, a nie tylko enzymy zewnątrzkomórkowe. Testy ekotoksykologiczne potwierdziły, że oczyszczanie biomasą grzybów znacząco obniża toksyczność ścieków, co potwierdza bezpieczeństwo środowiskowe uzyskanych efektów. Całość pracy dostarcza solidnych podstaw do projektowania zrównoważonych, zdecentralizowanych systemów oczyszczania ścieków opartych na grzybach białej zgnilizny.

Literatura (zebrana na str. 175-195), na którą autorka powołuje się w swojej dysertacji, jest cytowana zgodnie z kolejnością przytaczania w tekście, a jej spis obejmuje 303 pozycje. W tym spisie znalazłem również 3 prace we współautorstwie doktorantki (poz. 41, 143, 257), z czego dwie pierwsze były wymienione również w spisie na wstępie dysertacji. W znakomitej większości ($\approx 90\%$) wybrane przez doktorantkę pozycje reprezentują klasyczne artykuły naukowe. Chociaż najstarsza publikacja pochodzi z 1938, a cztery z lat '80 i '90 (przy czym ich zacytowanie było w pełni uzasadnione), bibliografia jest bardzo aktualna, z wyraźną dominacją publikacji z ostatniego pięciolecia (ok. 45%). Publikacje te można pogrupować na kilka kategorii tematycznych obejmujących: technologie oczyszczania ścieków z produkcji tekstyliów, w tym metody fizykochemiczne, biodegradację barwników przez grzyby i adsorpcje barwników na różnych podłożach, zagadnienia z enzymologii i biochemii, genomiki, transkryptomiki i proteomiki grzybów oraz toksykologii i oceny ryzyka środowiskowego barwników.

4. Uwagi krytyczne i dyskusyjne o charakterze edytorskim i merytorycznym

Recenzent nie rości sobie praw do oceny poprawności językowej, jako niebędący, w odróżnieniu od autorki, *native speakerem*. W mojej subiektywnej opinii praca jest napisana zrozumiałym językiem, opisy są jasne, a prowadzone wywody logiczne, mimo zawłości metodologicznych i wielowątkowości. Jednak, już choćby z racji na samą objętość pracy, a także zapewne w wyniku pośpiechu i zrozumiałego zmęczenia doktorantki na etapie końcowej edycji, trudno było uniknąć drobnych błędów, które nie wpływają w mojej ocenie na ostateczny osąd. Kilka z nich, wraz z dodatkowymi uwagami krytycznymi, pozwoliłem sobie wymienić poniżej:

1. Moim zdaniem omówienia literatury dotyczącej multiomiki i toksykologii powinny się znaleźć konsekwentnie w osobnych podrozdziałach, choćby ze względu na udział jaki mają w dalszej części pracy.
2. W publikacji [poz. 59], na którą powołuje się autorka pisząc „*They can affect fish, amphibians, and invertebrates' ability to reproduce, grow, and behave...*” autorzy dość ogólnie piszą o wpływie ścieków na ryby, raczej w kontekście wymienionego wyżej obniżenia stężenia DO niż toksyczności. Istnieje pewna ilość danych dotyczących wpływu barwników syntetycznych na ryby, obserwowano m. in. stres oksydacyjny, hepatotoksyczność, zmiany histologiczne skrzeli i ukł. sercowo-naczyniowego, zmiany strukturalne w tkankach, peroksydację lipidów, zmiany w aktywności enzymów antyoksydacyjnych, a nawet genotoksyczność (np. CR indukował mikrojądra i aberracje chromosomowe). Zainteresowało mnie zjawisko depozycji barwników w linii bocznej ryb, nie znalazłem informacji na temat permanentnego wysycenia tego organu.

3. str. 7 - „*Lemna gibba, a common duckweed...*” - praca cytowana jako poz. 62 mówi o zastosowaniu rzęsy *Lemna gibba* do biomonitoringu ścieków z przemysłu tekstylnego – i jako taka jest prawidłowo dobranym źródłem, jednak wymieniony gatunek to rzęsa garbata (*gibbous duckweed*), a nie *is common duckweed* - czyli *Lemna minor*.
4. str. 12. AOP – zwrot *głębokie (zaawansowane) utlenianie (advanced oxidation)* pojawia się wprawdzie we wstępie, ale brak jest powiązania ze skrótem – z zasady powinno się ono znaleźć pierwszy raz po użyciu w tekście.
5. Str. 57, Fig. 18. jest *Photo by ...*- w tym przypadku to zdecydowanie rysunek, ale również w przypadku części innych grafik niepotrzebnie pojawia się informacja o autorze zdjęcia. W mojej ocenie nawet jeżeli wykorzystano w rysunku pewne drobne elementy zdjęć (np. fragment gąbki), pozostaje to cały czas rysunek. Być może jest to wyraz nieco zbyt ostrożnego podejścia do praw autorskich – opracowany własnoręcznie rysunek bez dodatkowych uwag oznacza, że cała zawartość jest wytworem autora.
6. W polskiej wersji streszczenia na str. X jest „*zrównoważonej biologicznie alternatywę*”, powinno być - *zrównoważonej alternatywy* lub *biologiczną alternatywę*.
7. W całej pracy autorka z konsekwencją używa określeń *myjka z polipropylenu* i *gąbka* (np. str. 27 *Dishwasher-grade polypropylene [...] Sponge - Commercial polyurethane*) na określenie użytych w badaniach do immobilizacji biomasy grzybów nośników – w mojej ocenie powinno się raczej użyć bardziej naukowego, czy też technicznego określenia – chyba, że autorka sugeruje źródło zaopatrzenia bioreaktorów, albo np. wykorzystanie w tym celu odpadów. Oba używane w badaniach materiały, pomijając funkcjonalność ich aktualnej formy, są w zasadzie przykładami **syntetycznej piany o otwartych porach** (*open cell synthetic foam, PU foam, PP foam*) utworzonej w wyniku polimeryzacji danego tworzywa sztucznego (poliuretan lub polietylen) w określonych warunkach. Tego typu materiały można opisywać wieloma parametrami – najczęściej spotyka się PPI – mierzona liniowo liczbę **porów na cal** (*pore per inch*). Można również pokusić się o wyznaczenie eksperymentalne lub teoretyczne **powierzchni właściwej** (wyrażonej w cm^2/cm^3 lub g) co jest możliwe różnymi sposobami, np. na podstawie zdjęć struktury, które przecież wykonano. Autorka podaje jednocześnie pewne cechy nośników biomasy kluczowe dla opisu procesów badanych w pracy w kontekście właściwości barwników, np. na str. 68. „*The hydrophobic characteristics of the polypropylene dishwasher likely restrict dye sorption efficacy*, a dalej [...] *improved performance results from the high porosity, hydrophilicity, and increased surface area of the polyurethane substance* (str. 60), [...] *polypropylene dishwasher does not have tendency to absorb-desorb dye due to its hydrophobic nature*”.

Zachęcałbym do zainteresowania się tymi parametrami, jeżeli doktorantka planuje w przyszłości badania z wykorzystania nośników o podobnej strukturze.

8. Str 43. – wydaje się, że w zdaniu „*For non-coding RNAs such as long intergenic non-coding RNAs (lincRNAs) [tutaj] was removed using a Ribo-Zero RNA removal kit to enrich the RNA species of interest*” brakuje słowa **ribosomal RNA (rRNA)**.
9. Str 50. *ImageJ* jako niekomercyjny program naukowy powinno się cytować np. Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nature Methods, 9(7), 671–675. doi:10.1038/nmeth.2089*
10. Nieco błędów znalazłem w cytowanych pozycjach literatury: str. 175, poz. 13 – brakuje autora (Anshuman N.), str. 176, poz. 24. – brak autorów (Balasubramanian, C., Manickam, P.), str. 177, poz. 33 – wydaje się, że nie ma autorów, str. 178, poz. 59 – brak autorów (Ishrat Bashir, F. A. Lone, Rouf Ahmad Bhat, Shafat A. Mir, Zubair A. Dar & Shakeel Ahmad Dar), poz. 129 brakuje numeru czasopisma (15(1):6), poz. 130 brakuje końcówki numeru DOI (.14548), przez co czytelnik jest kierowany do innego artykułu, str. 183, poz. 136 – brakuje autorów (M. Jureczko., W. Przystaś., M. Urbaniak., A. Banach-Wisniewska., Ł. Stępień), str. 192. poz. 256 - pracę Cuamatzi-Flores i wsp. 2024 wymieniono w spisie dwukrotnie (łącznie z poz. 197), str. 165, poz. 300 – wydaje się brakować autora (Tepe, Ö?)
11. Nazwy gatunku w nomenklaturze taksonomicznej piszemy małą literą m.in. *Agaricus bisporus*, *Ceriporia lacerata*, *Diaporthe schini*, a przy braku określenia gatunku *Trametes sp.* – błędne zapisy występowały głównie w spisie literatury.

Jednocześnie rola recenzenta pozwala mi zadać kilka pytań, które proszę wziąć za objaw rozbudzenia ciekawości i zarzewie dyskusji, której na obronie zabraknąć nie powinno.

1. Testy toksyczności, szczególnie w ocenie ryzyka środowiskowego, wymagają wykorzystania organizmów modelowych reprezentujących wszystkie poziomy troficzne - również destruentów (najczęściej bakterie). Czy doktorantka, jako ekspert w zakresie reakcji grzybów strzępkowych, zna testy toksyczności wykorzystujące grzyby jako organizmy modelowe, a może gatunki badane w pracy nadają się w praktyce do tego celu? Jak wygląda, bądź powinna wyglądać, zdaniem doktorantki, procedura takiego badania.
2. Str. 48. „...using standard fresh water”- czy chodziło o wystandaryzowaną wodę (w takim razie o jakim składzie?) czy wodę wodociągową (*tap water*)?
3. Str. 50. Czy w metodyce testu fitotoksyczności zakładano też obserwacje ubytku żywej biomasy roślin testowych np. odejmowania powierzchni liści zajętych chlorozą? Czy obserwowano takie zjawisko?

4. Czy w przypadku danych transkryptomicznych, szczególnie na pierwszym etapie ich obróbki, powinniśmy mówić o już genach czy może raczej znacznikach (*tags*) ekspresji? Jak zdefiniowała by Pani różnice między tymi określeniami?
5. Na str. 44. czytamy - *For Gene Ontology (GO) and KEGG [...] pathway analyses, differentially expressed genes (DEGs) with an absolute fold change ≥ 2 [...]*. Czy w analizie RNAseq mamy do czynienia z absolutną, czy może jednak relatywną kwantyfikacją liczby kopii genów?
6. W ostatniej części pracy autorka pisze, że ważnym kierunkiem przyszłych badań będzie monitorowanie ekspresji genów w warunkach operacyjnych. W związku z tym nasuwa się pytanie, czy i jakie geny doktorantka zaproponowałaby do monitoringu i kontroli procesu w reaktorze z zastosowaniem np. ilościowego PCR (qPCR)?
7. Z danych multiomicznych wyłania się obraz organizmu, który prowadzi proces odbarwiania ścieków w warunkach silnego stresu, przebudowując swoją architekturę na różnych poziomach organizacji komórki w celu raczej przetrwania niż rozbudowy biomasy. Czy można wyobrazić sobie w takim razie układ technologiczny do oczyszczania ścieków tekstylnych, który funkcjonuje nieprzerwanie, utrzymaniem biomasy, czy raczej reaktor wspomagany porcjami biomasy produkowanej w reaktorze wstępnym, i np. co kilka cykli oczyszczania, usuwanej w celu desorpcji? Która forma biomasy byłaby najprzydatniejsza w takim układzie? Jak długo trwałoby namnożenie biomasy wystarczającej dla oczyszczania ścieków w skali technicznej?

5. Podsumowanie i wniosek końcowy

Pani Ruchi Manishkumar Upadhyay ubiega się o przyznanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk inżynieryjno-technicznych, dyscyplinie: inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka. Przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską przeczytałem z dużym zainteresowaniem i oceniam ją bardzo wysoko. Podkreślę jeszcze raz, że sam zakres analiz, koniecznych do osiągnięcia założonych przez doktorantkę celów stanowił ambitne wyzwanie - również dla recenzenta. **Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu**, szczególnie w części dotyczącej analizy multiomicznej biomasy grzybów prowadzących proces oczyszczania barwników. Implementacja nowoczesnych metod badawczych, również z zakresu biologii molekularnej, w inżynierii środowiska, staje się coraz częściej konieczna, aby skutecznie optymalizować parametry technologiczne w reaktorach biologicznych. Jednocześnie praca zachowuje charakter pozwalający przypisać ją do dyscypliny, a wszystkie osiągnięte wyniki są rozpatrywane w kontekście ich przyszłego zastosowania w pełnoskalowych układach inżynieryjnych.

Tym samym stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani M.Sc. 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 Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r., poz. 1571, z późn. zm.) i w związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Inżynieria Środowiska i Energetyka Politechniki Śląskiej o dopuszczenie M.Sc. Ruchi Manishkumar Upadhyay do publicznej obrony.

Jednocześnie, ze względu na wysoką wartość naukową i poznawczą pracy wnoszę do Rady Dyscypliny o wyróżnienie rozprawy.

Podpisał Łukasz Jurczyk