

Prof. dr hab. inż. Ewa Liwarska-Bizukojć
Politechnika Łódzka
Wydział Budownictwa, Architektury i Inżynierii Środowiska
Instytut Inżynierii Środowiska i Instalacji Budowlanych

Łódź, 08.04.2026

**Recenzja rozprawy doktorskiej 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”**

(tytuł w języku polskim

**„Określenie mechanizmu i optymalizacja warunków procesu usuwania barwnych
związków aromatycznych przez wybrane grzyby podstawkowe”)**

Promotor: prof. dr hab. inż. Wioletta Przysaś

Podstawą opracowania recenzji jest pismo Pana prof. dr hab. Krzysztofa Labusa, Przewodniczącego Rady Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka w Politechnice Śląskiej w Gliwicach, z dnia 06.03.2026 (RIE-BD.512.14.2026) dotyczące przygotowania oceny wspomnianej wyżej rozprawy doktorskiej.

Na wstępie recenzji chciałabym zaznaczyć, że rozprawa doktorska została napisana w języku angielskim.

Barwniki są szeroko stosowane w wielu gałęziach przemysłu, m.in. w przemyśle włókienniczym, papierniczym, w garbarstwie, czy do produkcji tworzyw sztucznych i towarzyszą nam w życiu codziennym. W 2023 roku wyprodukowano na świecie około 1,1 miliona ton barwników syntetycznych (pigmentów syntetycznych około 800 000 ton) i szacuje się, że do 2032 roku produkcja barwników i pigmentów będzie nadal rosła. W zależności od technologii barwienia znaczna część, bo nawet do 60% początkowej masy barwnika, może nie zostać wykorzystana i trafić do ścieków. Choć usuwaniem barwników ze ścieków naukowcy zajmują się już od wielu dziesięcioleci, to różnorodność chemiczna barwników oraz ich duże zużycie z jednej strony, a rozwój metod analitycznych, w tym bioinformatycznych z drugiej powodują, że jest to wciąż interesujący zarówno z praktycznego, jak i naukowego punktu widzenia temat. Dlatego też uważam, że wybór tematu pracy doktorskiej Pani mgr Ruchi Upadhyay jest właściwy i uzasadniony względami

naukowymi, a także możliwościami praktycznego wykorzystania uzyskanych w pracy wyników badań.

Głównym celem recenzowanej rozprawy doktorskiej było najogólniej mówiąc wykorzystanie grzybów białej zgnilizny drewna do usuwania z wód lub ścieków barwników syntetycznych reprezentujących według budowy chemicznej trzy główne grupy, to jest barwniki azowe (błękit Evansa (EB) i czerwień Kongo (CR)), barwniki trifenylometanowe (zieleń brylantowa (BG) i fiolet krystaliczny (CV)) oraz barwniki antrachinonowe (błękit brylantowy Remazol R (RBBR)). Łącznie Doktorantka badała pięć różnych barwników syntetycznych, a do ich usuwania zastosowała dwa gatunki podstawczaków, a mianowicie *Trametes versicolor* (szczep CB8) i *Pleurotus ostreatus* (szczep BWPH). Obydwa szczepy grzybów pochodziły z Kolekcji Szczepów Grzybów z Katedry Biotechnologii Środowiska Politechniki Śląskiej w Gliwicach. Zakres badań rozprawy doktorskiej obejmuje optymalizację procesów dekoloryzacji, ocenę toksyczności produktów dekoloryzacji, charakterystykę biosorpcji i biodegradacji barwników z udziałem grzybów białej zgnilizny drewna, a także zastosowanie technik omicznych, to jest analizy transkryptomicznej i proteomicznej, oznaczanie aktywności wybranych enzymów, do wyjaśnienia mechanizmów biodegradacji barwników. Uważam, że zakres prac, których podjęła się Doktorantka jest niezwykle szeroki i zasługuje na uznanie. Jest to kompleksowe i nowatorskie podejście do rozwiązania znanego naukowo problemu dekoloryzacji ścieków, zwłaszcza w części dotyczącej zastosowania analiz multiomicznych.

W rozdziale 3 Doktorantka trafnie zidentyfikowała kluczowe luki badawcze i na ich podstawie sformułowała rozbudowaną hipotezę badawczą. Zakłada ona, że wytypowane szczepy grzybów *Trametes versicolor* (szczep CB8) i *Pleurotus ostreatus* (szczep BWPH) będą zdolne do usuwania barwników na drodze synergii pomiędzy biosorpcją a enzymatycznym rozkładem. Poprawa wydajności tych procesów i ich potencjalne wykorzystanie w rozproszonych oczyszczalniach ścieków będzie możliwa dzięki optymalizacji parametrów procesowych. Mechanizmy usuwania barwników na drodze mykoremediacji zostaną poznane dzięki zastosowaniu technik omicznych, co umożliwić może w przyszłości predykcję i modelowanie przebiegu procesów dekoloryzacji dla innych barwników. Doktorantka założyła też, że produkt powstały w wyniku mykoremediacji będzie bezpieczny pod względem ekotoksykologicznym. Według mnie ta hipoteza, choć poprawna pod względem merytorycznym, to mogłaby być bardziej zwięzła lub wyraźnie podzielona na dwie lub trzy części. Byłoby to bardziej czytelne. Najważniejsze jest jednak, że Kandydatka z

sukcesem zweryfikowała postawioną hipotezę prowadząc szeroko zakrojone badania, analizując dogłębnie ich wyniki i formułując odpowiednie wnioski.

Rozprawa doktorska została podzielona na 7 rozdziałów poprzedzonych streszczeniami i słowami kluczowymi w języku angielskim i polskim, listą własnych publikacji z tematu pracy doktorskiej oraz listą skrótów zastosowanych w rozprawie doktorskiej. Doktorantka podała także źródła finansowania badań. Lista skrótów mogłaby być bardziej kompletna (np. nie ma KEGG, GO, MEA), ale rozumiem, że przy tak dużej liczbie zastosowanych metod analitycznych i statystycznych, jest to prawie niemożliwe, żeby czegoś nie pominąć. Chciałabym też dodać, że Doktorantka w treści pracy na ogół wyjaśniała użyte skróty i symbole, co ułatwiało zrozumienie tekstu. W ostatniej części pracy doktorskiej, po rozdziale 7, znajduje się lista cytowanych publikacji, załączniki, spis wykresów i tabel. Zaproponowany podział rozprawy doktorskiej jest logiczny i odpowiedni dla tego typu pracy naukowej.

Zanim przejdę do dalszej oceny pracy doktorskiej chciałabym podkreślić, że mgr Ruchi Upadhyay jest współautorką 4 artykułów naukowych z tematu swojego doktoratu. Wszystkie te artykuły ukazały się w czasopiśmie posiadającym tzw. współczynnik wpływu (IF) w latach 2022-2025.

Recenzowana praca doktorska zawiera 63 rysunki oraz 19 tabel, nie licząc dwóch rysunków i pięciu tabel zamieszczonych w załączniku. Według mnie Doktorantka dobrze udokumentowała wyniki przeprowadzonych badań i opracowania statystycznego danych. Wszystkie tabele są czytelne i w pełni zrozumiałe. Rysunki również zostały bardzo starannie przygotowane i może poza dwoma (rys. 4 i rys. 36), które wg mnie wymagają niewielkiej korekty edycyjnej, bardzo dobrze wizualizują przeprowadzone badania i ich rezultaty. Przygotowane przez Doktorantkę tabele i rysunki świadczą o dużym zaangażowaniu Autorki, o Jej dojrzałości i umiejętności przekazywania wiedzy naukowej. Chciałabym pochwalić Doktorantkę zwłaszcza za rysunki zamieszczone w rozdziale 4, które są przejrzyste, estetyczne i dobrze ilustrują zastosowaną w pracy metodologię badań. Podpisy rysunków i tabel zostały zredagowane poprawnie. Odniesienia w tekście do rysunków i tabel są prawidłowe, zamieszczone w odpowiednich miejscach, co sprawia, że tekst i elementy graficzne stanowią integralną całość. Ułatwia to także lekturę pracy doktorskiej.

Język, którego Autorka używa w pracy jest w mojej ocenie poprawny. Jest to język naukowy, odpowiedni dla rozprawy doktorskiej. Błędów językowych, stylistycznych i interpunkcyjnych jest bardzo mało. Kilkakrotnie miałam wątpliwości odnośnie przedimków „the”, czy nietypowych wyrażań, ale trudno mi to jednoznacznie ocenić i zakwalifikować

jako błąd, ponieważ nie jestem native-speakerem. Uważam, że jako całość praca doktorska była dla mnie napisana językiem zrozumiałym, merytorycznym, naukowym.

Pod względem edycyjnym rozprawa doktorska jest bardzo dobrze przygotowana. Nie znalazłam pomyłek w numeracji rysunków, czy tabel ani w podpisach, ani w odnośnikach, choć jak już wspominałam praca jest bogato ilustrowana. Numeracja rozdziałów, podrozdziałów, równań jest według mnie także poprawna. Skróty i symbole są wyjaśniane wielokrotnie w tekście, co pomaga w czytaniu pracy. Trzeba tu podkreślić, że panowanie nad dużą liczbą skrótów i symboli, która według moich szacunków wynosi powyżej 100, jest bardzo trudnym zadaniem. Mimo to Doktorantka bardzo dobrze się z niego wywiązała. Starła się, aby pomimo szerokiego zakresu i dużej różnorodności zastosowanych metod badawczych, wszystko było jasno i precyzyjnie przedstawione. Pod względem formalnym oceniam pracę bardzo wysoko.

W przeglądzie literatury przedmiotu stanowiącym drugi rozdział rozprawy doktorskiej Autorka charakteryzuje barwniki, a w szczególności barwniki syntetyczne, następnie krótko opisuje wpływ barwników na ekosystemy i zdrowie człowieka, a w dalszej części wymienia i zwięźle omawia metody fizyczne, chemiczne i biologiczne usuwania barwników. Stosunkowo najwięcej miejsca Doktorantka poświęciła przeglądowi publikacji dotyczących stosowania grzybów białej zgnilizny drewna do degradacji barwników. Jest to moim zdaniem słuszne podejście, bo przegląd literatury ma pomóc w identyfikacji luk badawczych i zagadnień związanych z mykoremediacją, które do tej pory nie zostały wystarczająco wyjaśnione. Według mnie dobór zagadnień i źródeł literaturowych był właściwy i pozwolił Doktorantce trafnie wskazać brakujące elementy w obecnym stanie wiedzy na temat usuwania barwników syntetycznych przy udziale grzybów podstawkowych, co z kolei przełożyło się na sformułowanie merytorycznie zasadnych celów, zakresu i hipotezy badawczej Jej rozprawy doktorskiej.

Sumarycznie w całej pracy Doktorantka skorzystała z imponującej liczby 304 źródeł literaturowych anglojęzycznych. Były to prawie wyłącznie artykuły naukowe. Blisko połowa (47%) spośród zacytowanych prac została opublikowana w latach 2020-2025. Kandydatka korzystała zatem w głównej mierze z najnowszych, aktualnych osiągnięć naukowych związanych z tematem Jej dysertacji. Dobór źródeł literaturowych uważam za wyczerpujący, prawidłowy i aktualny. Wskazuje on na ciągle zainteresowanie wielu zespołów badawczych na świecie tematyką usuwania barwników syntetycznych ze środowiska przyrodniczego.

W rozdziale czwartym recenzowanej rozprawy doktorskiej Autorka omówiła bardzo szczegółowo materiały i metody badawcze zastosowane w pracy. Ten rozdział składa się z 16

podrozdziałów. Doktorantka opisała w nich m.in. wybrane do badań barwniki syntetyczne, zastosowane szczepy grzybów podstawkowych, warunki ich hodowli, immobilizację grzybni na dwóch nośnikach, metody oznaczania aktywności trzech enzymów (lakazy, peroksydazy manganowej i peroksydazy ligninowej), analizę transkryptomoczną i proteomiczną dla *Trametes versicolor*, metody statystyczne. Obszerność tego rozdziału pracy wynika z szerokiego zakresu badań i zastosowania wielu metod analitycznych, a także zaawansowanego opracowania danych z pomocą różnych metod statystycznych, w tym z jedno- i dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), testu post-hoc Tukeya, analizy głównych składowych (Principal Component Analysis, PCA). Do zastosowania tych metod statystycznych Doktorantka musiała opanować obsługę kilku programów komputerowych. Oprócz MS Excel były to m.in. Design-Expert (Stat-Ease), OriginPro Learning Edition (OriginLab). Do analizy genów i białek niezbędna była umiejętność posługiwania się narzędziami bioinformatycznymi, w tym przede wszystkim KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) oraz GO (Gene Ontology). Wykorzystanie tak wielu różnorodnych metod badawczych, analitycznych i statystycznych od stosunkowo prostych testów dekoloryzacji po zaawansowane narzędzia bioinformatyczne wymagało wiedzy, bardzo dobrego przygotowania, m.in. z zakresu mikrobiologii, chemii, matematyki, inżynierii, statystyki, posiadania już na początku realizacji pracy badawczej solidnego warsztatu naukowego, który w trakcie realizacji pracy Doktorantka doskonaliła.

Wyniki badań, ich omówienie i dyskusja przedstawione są razem w piątym, najobszerniejszym rozdziale recenzowanej rozprawy doktorskiej. W mojej ocenie połączenie prezentacji wyników i ich dyskusji jest w pełni uzasadnione, a odniesienie uzyskanych wyników do istniejących, opublikowanych danych ułatwia czytelnikowi lekturę pracy i pokazuje, co udało osiągnąć się Doktorantce na tle dotychczasowej wiedzy. Wyniki zostały zaprezentowane w tabelach i na rysunkach, ułożone w sposób logiczny i dokładnie przedyskutowane. Autorka rozpoczyna ten rozdział od oceny wzrostu dwóch wytypowanych szczepów grzybów i możliwości zastosowania dwóch różnych nośników (polipropylenowego i poliuretanowego) do immobilizacji grzybni oraz od prezentacji wyników wstępnych/przesiewowych testów dekoloryzacji przeprowadzonych dla pięciu barwników. Następnie omawia wpływ kilku czynników, takich jak mieszczanie, źródło węgla, źródło azotu w pożywce, immobilizacja na skuteczność usuwania barwników. Te badania, które można nazwać optymalizującymi warunki hodowli grzybów, zostały przeprowadzone dla trzech barwników, a mianowicie dla błękitu brylantowego Remazol R (RBBR), błękitu Evansa (EB) i fioleto krystalicznego (CV), które zostały wytypowane na podstawie

wstępnych testów dekoloryzacji. Kolejny podrozdział jest poświęcony aktywności enzymatycznej lakazy, peroksydazy manganowej i peroksydazy ligninowej oznaczanych dla dwóch szczepów grzybów eksponowanych na działanie jednego z trzech wymienionych wyżej barwników syntetycznych. Następnie Doktorantka dużo miejsca poświęciła wynikom analizy transkryptomicznej i proteomicznej. Analizy te zostały przeprowadzone dla jednego, wytypowanego na podstawie wcześniejszych badań szczepu grzyba, a mianowicie dla *Trametes versicolor* eksponowanego na działanie jednego z dwóch barwników (błękitu brylantowego Remazol R (RBBR) lub błękitu Evansa (EB)) w przypadku analizy transkryptomicznej lub jednego z trzech barwników błękitu brylantowego Remazol R (RBBR), błękitu Evansa (EB) lub fioletu krystalicznego (CV) w przypadku analizy proteomicznej. Doktorantka przeprowadziła też testy ekotoksyczności z udziałem dafni (*Daphnia magna*) oraz ze spirodelą wielokorzeniową (*Spirodela polyrhiza*) oceniając toksyczność trzech barwników (RBBR, EB i CV) oraz produktów powstałych po ich rozkładzie i usuwaniu z udziałem grzybów białej zgnilizny drewna. Doktorantka obserwowała na ogół obniżenie toksyczności po procesach mykoremediacji z udziałem obydwu badanych szczepów grzybów. Ostatnie trzy podrozdziały w rozdziale „Wyniki badań i dyskusja” poświęcone są wpływowi warunków oświetlenia na degradację barwników, biosorpcji barwników oraz zastosowaniu bioreaktorów do dekoloryzacji ścieków. Ten trzeci podrozdział jest bardzo krótki i pozostawia pewien niedosyt.

We wnioskach (rozdział 6) Autorka najpierw odniosła się do hipotezy badawczej. Potwierdziła, że udało się ją zweryfikować dzięki starannie przeprowadzonym badaniom i analizie ich wyników. Następnie w kilkunastu punktach przedstawiła najważniejsze osiągnięcia swojej pracy doktorskiej. Według mnie zrobiła to w sposób jasny i przekonujący wykazując oryginalność przeprowadzonych badań i własny wkład w rozwój inżynierii środowiska. Co ważne Doktorantka nie poprzestała na wnioskach, ale wskazała też dalsze kierunki badań nad dekoloryzacją ścieków z udziałem grzybów białej zgnilizny drewna. Według mnie zostały one trafnie zidentyfikowane. Na pewno warto byłoby rozwinąć badania bioreaktorowe i przeprowadzić je w większej skali stosując jako substrat nie tylko pożywkę, ale też ścieki rzeczywiste zawierające barwniki syntetyczne.

Do recenzowanej pracy mam trzy uwagi, a raczej pytania merytoryczne, do których Doktorantka powinna odnieść się podczas obrony rozprawy doktorskiej.

Pierwsze z nich dotyczy badań prowadzonych w bioreaktorach. Jaka była objętość całkowita i robocza bioreaktorów? Jak one były wyposażone, np. prosiłabym o podanie sposobu mieszania, kontroli pH czy stężenia tlenu rozpuszczonego?

Drugie pytanie dotyczy badań omicznych. Czas ekspozycji grzybni *Trametes versicolor* na barwnik wynosił 24 godziny w przypadku badań transkryptomicznych, a 48 godzin w przypadku analizy proteomicznej. Dlaczego takie czasy dobrano i skąd różnica pomiędzy nimi? Dlaczego stężenie barwników wynosiło 250 mg/l w tych badaniach?

Kolejna rzecz, o którą chciałabym zapytać, związana jest z interpretacją wyników oznaczenia aktywności enzymów, to jest lakazy i peroksydaz. Jakie są przyczyny tego, że aktywność enzymów, np. lakazy, była w niektórych seriach z barwnikami (np. EB lub CV na nośniku poliuretanowym) na poziomie zbliżonym lub niższym niż w serii kontrolnej?

Mimo przedstawionych powyżej uwag i pytań uważam, że recenzowana praca jako całość jest rozprawą doktorską o wyjątkowo dobrej jakości. Jak już wspominałam praca wyróżnia się pod względem zakresu badań (dwa szczepy grzybów, w pierwszych etapach badań pięć barwników syntetycznych, potem trzy z nich), wielości zastosowanych technik (m.in. testy dekoloryzacji, testy sorpcji, testy ekotoksyczności, techniki omiczne) i staranności opisu uzyskanych wyników.

Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki, poszerzających wiedzę w zakresie inżynierii i biotechnologii środowiska, zaliczyłabym wykazanie, że dwa szczepy grzybów białej zgnilizny drewna *Trametes versicolor* i *Pleurotus ostreatus* mogą być wykorzystane w procesach biodegradacji niektórych barwników syntetycznych, a powstałe produkty nie są bardziej toksyczne dla biotycznej części ekosystemów wodnych niż czysty roztwór barwnika. Ponadto Doktorantka wykazała, że optymalizacja procesów biologicznego usuwania tych barwników z pomocą grzybów wymaga doboru odpowiednich warunków ich prowadzenia, a w szczególności intensywności mieszania i źródła azotu, które okazały się mieć największy wpływ na skuteczność odbarwiania. Istotnym osiągnięciem tego doktoratu jest według mnie znalezienie z pomocą technik omicznych zależności pomiędzy aktywnością biochemiczną, degradacyjną grzybni a ekspresją genów związanych z metabolizmem oksydacyjnym, czy wewnątrzkomórkową detoksykacją. Doktorantka wykazała, że w przypadku *Trametes versicolor* poddanego działaniu barwników błękitu brylantowego Remazol R lub błękitu Evansa wśród genów o podwyższonej ekspresji w stosunku do kontroli znalazły się monooksygenazy cytochromu P450, oksydoreduktazy zależne od NAD(P)H, ketoreduktazy i dehydrogenazy aldehydowe, a także geny związane z transportem.

Podsumowując recenzję stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Ruchi Upadhyay spełnia wymogi określone w stosownych przepisach Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. –Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r., poz. 1571, z późn. zm.). W związku z tym wnioskuję do Rady Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka Politechniki

Śląskiej w Gliwicach o dopuszczenie Pani mgr Ruchi Upadhyay do dalszych przewidzianych przepisami etapów postępowania doktorskiego. Jednocześnie składam wniosek o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej. Wniosek ten uzasadniam przede wszystkim bardzo wysoką jakością przeprowadzonych badań, ich interdyscyplinarnym charakterem, wielością zastosowanych nowoczesnych technik analitycznych, co zaowocowało uzyskaniem kompleksowych danych na temat mykoremediacji niektórych barwników syntetycznych.

Podpisała Ewa Liwarska-Bizukojć