



Poznań, dn. 02.06.2023

Prof. dr hab. Piotr Przybylski
Zakład Chemii Produktów Naturalnych

Recenzja cyklu prac/rozprawy doktorskiej mgr inż. Amandy Pacholak
*pt. „The exploitation of selected environmental bacteria
in the removal of 5-nitrofuran derivatives”*

Recenzja została sporządzona w odpowiedzi na pismo Pani Dziekan Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej prof. dr. hab. Ewy Kaczorek z dnia 25 kwietnia 2023 roku w związku z prowadzeniem przewodu doktorskiego mgr inż. Amandy Pacholak. Przedłożona do oceny praca doktorska została wykonana w Zakładzie Chemii Organicznej, Instytutu Technologii i Inżynierii Chemicznej Politechniki Poznańskiej pod kierunkiem prof. dr. hab. Ewy Kaczorek w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplina - nauki chemiczne, a dokładniej w obszarze zainteresowań Pani Promotor czyli biotechnologii środowiskowej (biodegradacja/bioremediacja i analiza biomateriałowa).

Ocena organizacji dysertacji

Jako dokumentacja niezbędna do przygotowania recenzji dostarczona została dysertacja przygotowana w formie Autoreferatu (przewodnika), do którego dołączone zostały kopie publikacji. Ścisłej rzecz ujmując, praca została przedstawiona w j. angielskim i ma formę „spinki” z pięciu publikacji (**P1-P5**) z przewodnikiem/komentarzem zawierającym: streszczenie dające tło literaturowe (Chapter 1), cele pracy i hipotezy (Chapter 2), wyniki z publikacji **P1-P5** (główny przedmiot postępowania) wraz z danymi bibliometrycznymi (Chapter 3) a także z prac dodatkowych **S1-S3** (powiązanych ale nie wchodzących w skład rozprawy), część opisową opublikowanych prac oraz prac dodatkowych (Chapter 4) a także z podsumowanie ogólne (Chapter 5). Do dysertacji zostały dołączone informacje o osiągnięciach naukowych Doktorantki (publikacje, wyjazdy naukowe, konferencje, nagrody i udział w projektach, członkostwo w organizacjach i inne; str. 76-81) i następujące załączniki: A – kopie prac **P1-P5**, B – przedstawienie Doktorantki wkładu w powstałe prace **P1-P5**, i C – analiza wkładu innych współautorów publikacji **P1-P5** wraz z ich oświadczeniami. Całość materiału poddanego ocenie

nie budzi zastrzeżeń, przy czym ocena części naukowej z komentarzem do publikacji z jednoczesnym wertowaniem stron i odniesieniem do załączonych publikacji na końcu była nieco uciążliwa... **Pomocne mogłyby być tutaj kopie elektroniczne publikacji P1-P5 załączone na nośniku ...** Uważam również, że wprowadzenie do przewodnika dysertacji prac dodatkowych S1-S3, niebędących głównym przedmiotem dysertacji, wprowadziło niemałe zamieszanie, pomimo tego, że wyniki wydają się być uzupełniające do tych otrzymanych w ramach prac P1-P5. W tym miejscu nasuwa się pytanie dlaczego prace S1-S3 nie zostały włączone do dysertacji? **Omówienie struktury dysertacji było pomocne, przy czym Recenzent po zapoznaniu się z tą strukturą dopiero na str. 27 był w pełnej konsternacji...** Przyznam, że tak „zawile” zbudowanej dysertacji w odniesieniu do oczekiwanej uproszczonej formy „spinki” nie przeczytałem już dawno... W tym miejscu pozwolę sobie na pewien komentarz dotyczący formy przedstawienia dysertacji - tzw. „spinki z publikacji”, która wbrew pozorom nie jest wogóle korzystną dla młodego adepta nauki formą, ponieważ w klasycznej opisowej formie dysertacja umożliwia przedstawienie pełnej autorskiej „narracji” naukowej, przekazanie toku rozumowania wraz z rozwijanymi koncepcjami oraz ukazuje możliwości Kandydata/cki w zakresie dyskusji wyników naukowych zawartych w pracy. Niemniej jednak należy stwierdzić, że praca została zrealizowana zgodnie Ustawą Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r.

Ocena znaczenia podjętej tematyki badań

Prace (P1-P5) będące podstawą dysertacji, dotyczą niezwykle ważnego i istotnego problemu środowiskowego, tj. wykorzystania obecnych w środowisku szczepów bakteryjnych w kierunku rozkładania związków aktywnych biologicznie i ich metabolitów (np. antybiotyków stosowanych na ludziach czy zwierzętach), których obecność przyczynia się do zanieczyszczenia środowiska naturalnego. Wybranych przez Doktorantkę obiektami degradacji przez środowiskowe szczepy bakteryjne, były pochodne nitrofuranu (**nitrofurantoina /NFT/**, **furaltadon /FTD/**). Ogólnie znane z literatury właściwości biologiczne całej grupy nitrofuranów to aktywność bakteriobójcza, bakteriostatyczna, przeciwpierwotniakowa, przeciwgrzybicza a nawet przeciwnowotworowa. Wiadomo też, że związki z tej grupy, oprócz pożytecznych właściwości, wykazały również silną genotoksyczność, a przecież wcześniej stosowane były w

łańcuchu produkcji żywności (leki weterynaryjne, konserwanty) co stawiało dalej pytanie odnośnie bezpieczeństwa stosowania ich oraz wpływu strukturalnie powiązanych metabolitów na organizm ludzki (zakaz w UE stosowania przy produkcji żywności od 1995 r.). Obecnie tj. od grudnia 2019 r., zgodnie z zaleceniami EMA (*European Medicines Agency*), syntetyczne nitrofuranowe antybiotyki takie jak np. furaltadon (FTD) i furazolidon (FZD) mają status tzw. „D – stosować rozważnie”. Zatem podjęty przez Doktorantkę temat rozprawy bez wątpienia jest aktualny i istotny z punktu widzenia zarówno zdrowia jak i bezpieczeństwa człowieka oraz czystości naszego środowiska.

Ocena tła literaturowego

Autorka pracy w ramach tła literaturowego wprowadza w zagadnienia dotyczące antybiotyków, przedstawia ich podział ze względu na otrzymanie i ich sposób działania, porusza problem ich szerokiego zastosowania i wpływu na zanieczyszczenie środowiska. Problemy z wprowadzaniem nowych antybiotyków w ostatnich latach Autorka wiąże z trudnościami ekonomicznymi, w zakresie regulacji (prawdopodobnie prawnych) i badaniami klinicznymi natomiast przyczyna tkwi także w tym, że proste cząsteczki syntetyczne takie jak nitrofurany wykazują często, pomimo korzystnego działania, „nieoczekiwaną i nieobliczalną” toksyczność a z kolei modyfikacje struktur „znanych” bakteriom antybiotyków (produktów naturalnych) są czasochłonne i trudne do przeprowadzenia w efektywny sposób, tak aby nie indukowały dalszej oporności u bakterii. Niestety złą informacją jest fakt, że wiemy już o istnieniu szczepów opornych na działanie naszego całego arsenału dostępnych antybiotyków a zatem poszukiwania nowych środków przeciwbakteryjnych stają się coraz trudniejsze w perspektywie tych dwóch powyższych strategii. Zupełnie osobnym podejściem do opracowywania nowych antybiotyków jest generowanie *in situ* antybiotyków wykorzystując przepływ informacji genetycznej i manipulacja pojedynczymi genami zmieniająca ścieżki biosyntetyczne naturalnych antybiotyków (w ujęciu hybrydowym z metodami syntetycznymi) z którymi wiąże się coraz większe nadzieje na przezwycięzenie oporności bakterii. **W uszeregowaniu antybiotyków „ryfamycyny” zostały włączone do grupy „other antibiotics” podczas gdy ryfamycyny są podgrupą ansamycyn – ansamakrolidów. We wstępie Doktorantka oddzieliła antybiotyki antracyklinowe od tetracyklin (str. 3) – oczekuję w ramach obrony aby Doktorantka pokazała i omówiła**

różnice pomiędzy tymi antybiotykami. Dalej we wstępie Autorka opisuje charakterystykę nitrofuranów uwzględniając ich struktury, zastosowanie i formułacje a także informacje z zakresu metabolizmu i stwierdza na str. 5, na podstawie doniesień literaturowych, że nitrofurantoina (NFT) w organizmie ludzkim nie jest całkowicie metabolizowana (<50%, z niskim parametrem „half-life”) i jest wydalana w postaci niezmienionej z moczem. Jeżeli spojrzymy na strukturę NFT to obecne w centralnej części wiązanie podwójne C=N jest bardzo podatne na hydrolizę, jak np. w ryfamycynach (np. ryfampicynie czy rifapentynie) co jest jedną z dróg uzyskiwania oporności przez bakterie na ryfamycynowe antybiotyki. **Czy Doktorantka mogłaby skomentować ten problem? Poza tym, możliwym jest z udziałem enzymów grupy cyt. P450 przeprowadzenie redukcji czy utlenienia NFT w różnych częściach cząsteczki ...Nasuwa się zatem pytanie czy znane są struktury innych metabolitów NFT w organizmie ludzkim (poza aminohydantoiną AHD) po zastosowaniu leku w terapii infekcji dróg moczowych bakteriami szczepów Gram(-)?** Z kolei opisywany przez Doktorantkę furaltadon (FTD), antybiotyk zwierzęcy i promotor wzrostu zwierząt hodowlanych, jest wysoce toksyczny ze względu na potencjalne zróżnicowane reakcje metaboliczne i tendencję do wiązania się jego metabolitów takich jak AMOZ (3-amino-5-morfolino-metylo-1,3-oksazolidynon) z tkankami. Dalej w ramach wstępu zostaje opisana historia regulacji prawnych ograniczających możliwą zawartość głównych metabolitów nitrofuranów, który obecnie wynosi 0,5 µg/kg (dotyczy UE i USA). Kolejny rozdział wstępu poświęcony jest problemowi importu produktów z różnych stron świata zawierających metabolity SEM, AOZ, FZD czy 5-NF w ilościach przekraczających normy EU gdzie Doktorantka przedstawiła sprawnie aktualny stan wiedzy i zagrożeń. Konsumpcja antybiotyków w naszym kraju została także porównana przez Doktorantkę z rynkiem całej UE i Chin oraz została omówiona obecność antybiotyków w środowisku globalnie a wnioskiem jest postępujące zagrożenie zanieczyszczeniem środowiska szczególnie w krajach mniej rozwiniętych, gdzie inne trudności bytowania „przesłaniają” ten istotny problem. Doktorantka we wstępie omawia także zależności środowiskowe związane z przedostawaniem się antybiotyków i ich metabolitów do wód i gleby oraz ich „mobilnością” w środowisku, obecny stan wiedzy w zakresie oddziaływania nitrofuranów na mikroorganizmy, rośliny czy organizmy wodne a zwłaszcza te obecne w otaczającym nas środowisku (problem ekotoksyczności). W kolejnym rozdziale krytycznie opisuje strategie usuwania antybiotyków ze środowiska z udziałem metod

fizycznej i chemicznej remediacji czy też bioremediacji, obejmującej fitoremediację lub remediację mikrobiologiczną, które są bardziej zgodne z trendami „green”. Autorka wskazuje m.in., że np. leki metabolizowane przez środowiskowe mikroorganizmy (biodegradacja pierwotna poprzez biotransformację) mogą być przekształcane w związki o bliżej nieokreślonej toksyczności (np. trwale zmieniające ekosystem) natomiast ostateczna biodegradacja poprzez mineralizację prowadzi do produktów takich jak CO₂, H₂O, sole mineralne i biomasa. Autorka chcąc podkreślić przyczynę podjęcia swoich badań stwierdziła zasadnie, że metody fizykochemiczne w usuwaniu nitrofuranów mogą napotkać wiele technicznych problemów (agregacja nanocząstek, słaba adsorpcja polutantów, czy też możliwy niekorzystny wpływ użytych nanomateriałów na środowisko) natomiast niewiele danych opublikowano do tej pory w odniesieniu do ich mechanizmu działania przeciwdrobnoustrojowego i metod biologicznych degradacji. W podsumowaniu można stwierdzić, że Doktorantka wykazała wiedzę z zakresu: ogólnych zagadnień związanych z koncepcjami bioremediacji, regulacji prawnych dotyczących antybiotyków nitrofuranowych oraz zagrożeń dla naszego środowiska jakie niesie niekontrolowane lub nadmierne użycie antybiotyków.

Ocena celu dysertacji

Za cele Doktorantka obrała sobie określenie wpływu mieszanej społeczności drobnoustrojów na efektywną degradację nitrofuranów (hipoteza H-1). Innym istotnym zagadnieniem miało być ustalenie wpływu produktów degradacji nitrofurantoiny (NFT) na cechy komórek bakteryjnych (H-2) oraz zmieniającej się aktywności metabolicznej szczepów bakterii w procesie biodegradacji NFT (H-3). Kolejnym wyzwaniem miało być także zbadanie wpływu antybiotyków nitrofuranowych na strukturę oraz właściwości społeczności szczepów bakterii środowiskowych (H-4 i H-5). Ocena wpływu wydłużonego czasu ekspozycji nitrofuranów (w zależności od typu związku) na działanie zbioru szczepów bakteryjnych miała z kolei na celu odnotowanie rodzaju zmian w strukturze komórek bakteryjnych i ich metabolizmie (H-6). Cele zostały postawione przez Doktorantkę ambitnie a ich realizacja wymagała szerokiej wiedzy interdyscyplinarnej i umiejętności eksperymentalnych z pogranicza nauk biologicznych i chemicznych.

*Ocena wkładu Doktorantki w powstanie cyklu prac **P1-P5** oraz jego zawartości merytorycznej*

Na wstępie należy zaznaczyć, że mgr. inż. Amanda Pacholak wniosła istotny i decydujący wkład w powstanie cyklu prac **P1-P5** na co wskazują nie tylko rola pierwszego i korespondencyjnego Autora ale także analiza oświadczeń współautorów przedstawionego cyklu prac. Do realizacji prac **P1-P5** mgr inż. Amanda Pacholak zaprosiła szerokie grono ekspertów z różnych specjalności: chemii materiałowej, analityki, metabolomiki, filogenetyki, biochemików czy też biologów bez których prace te nie miałyby tak szerokiego wymiaru naukowego. Publikacje **P1-P5** tworzą dwa bloki tematyczne: a) prace **P1, P3 i P5** dotyczą krótkoterminowej ekspozycji nowo wyizolowanych szczepów bakteryjnych i konsorcjów bakteryjnych na NFT i b) prace **P2 i P4** dotyczą długoterminowej ekspozycji szczepów bakteryjnych na FTD i NFT.

W pracy **P1** dokonano izolacji pojedynczych nowych szczepów bakteryjnych z komunalnych i wiejskich osadów czynnych, określono ich wpływ na możliwość degradacji NFT oraz oceniono zmiany we właściwościach komórek bakteryjnych hodowanych w obecności NFT. **W części autoreferatu dotyczącego tych prac (str. 33) pojawia się błędny skrót „NTF” zamiast „NFT”.** W sumie pięć szczepów bakteryjnych, izolowanych ze ścieków strefy miejskiej (3) i wiejskiej (2), scharakteryzowanych (na pobranym DNA analiza iTag z sekwencjonowaniem genów 16S rRNA /PCR/) z określonym biochemicznym profilem, zostało dalej poddanych działaniu NFT w czasie 24 h. Oznaczanymi parametrami były przepuszczalność (wewnątrz błonowa /IMP/ i całkowita/TMP/) hydrofobowość powierzchniowa komórek bakteryjnych (CSH) i aktywność metaboliczna (MetAct), które są kluczowe w poznaniu wpływu ksenobiotyków na rozwijające się w ich obecności mikroorganizmy. Największe różnice zaobserwowano dla szczepu *Sphingobacterium thalpophilum* P3d /Gram(-)/, u których spadek przepuszczalności zarówno całkowitej, jak i wewnętrznej błony (odpowiednio z 86,7% do 48,3% oraz z 0,49 do 0,42 $\mu\text{M min}^{-1}$) zasugerował wyraźną odpowiedź obronną na obecność NFT jako ksenobiotyku. **Inaczej sprawa ma się odnośnie wzrostu hydrofobowości powierzchni komórek bakteryjnych (CSH od 28,3% do 39,7%) i aby stwierdzić czy zmiana tego parametru jest związana z „właściwą/oczekiwaną” odpowiedzią obronną przeciwko NFT m.in. należy zastanowić się czy NFT jest związkiem hydrofilowym czy hydrofobowym (jakie jest logP?) i jak ten parametr może być odniesiony do struktury bariery komórkowej u tego typu bakterii Gram(-)?** W wyniku badań określono też różny stopień usuwania NFT w ciągu 28 dni przez pojedyncze izolowane szczepy bakteryjne tj. od 50 – >90%, gdzie najefektywniejszym w

pierwotnej biodegradacji był szczep *Sphingomonas paucimobilis* K3a /Gram-(-)/ z obszarów wiejskich, nie indukujący α i β hemolizy. Podczas badań dotyczących ustalania kinetyki biodegradacji NFT przez bakterie została wykorzystana metoda HPLC-MS² z jonizacją API (Atmospheric Pressure Ionization) i pytanie jakie zostało docelowo zastosowane źródło jonizacji? Biorąc pod uwagę możliwy różny stopień jonizacji NFT i jego metabolitów mam pytanie czy wyznaczony został współczynnik przeniesienia do fazy gazowej przed docelową analizą? W publikacji P1 na Fig. 3 ukazane są wyniki analizy HPLC-MS² i w związku z tym mam pytania o to: a) dlaczego podany jest $m/z=152$ (Fig. 3 - P1) skoro skład jonu sugeruje $m/z=153$ a z kolei skład jonu o $m/z = 124$ (Fig. 3 - P1) nie odpowiada jonowi pokazanemu tylko innemu o $m/z=126$; b) Czy Autorka zastanawiała się w jaki sposób jon o $m/z = 237$ przekształca się w te rozpadowe – mając taki pogląd można bardziej urealnić interpretacje danych odnośnie metabolitów? Interesującym wynikiem było ustalenie, że największemu spadkowi aktywności metabolicznej (MetAct) komórek (*Rhizobium radiobacter* P4c) nie towarzyszyła najmniejsza szybkość degradacji (*Pseudomonas aeruginosa* P4a). Ogólnie w ramach tej pracy wykazano, że pomimo zdolności degradacji NFT przez wyizolowane mikroorganizmy związek ten może zmieniać istotnie cechy komórek bakteryjnych.

W pracy P3 podjęto problem wydajności biodegradacji NFT w trzech punktach czasowych przez konsorcja bakteryjne izolowane z górskiego strumienia (oznaczenie NW) i wody morskiej w porcie (oznaczenie SS). Na wstępie określono dla pobranych próbek dominujące szczepy bakteryjne w obu środowiskach, które w przybliżeniu występowały w ilościach ~40% i 20% dla NW i 30% oraz 25% dla próbki SS. W pracy tej Doktorantka poszukując najlepszego sposobu monitorowania postępu degradacji NFT zastosowała derywatyzację jego metabolitów (AHD = 1-aminohydantoina; SEM = semikarbazyd; HYD = hydrazyna) za pomocą 2-nitrobenzaldehydu (NBA), gdzie jako narzędzie analityczne zastosowana została metoda LC/MS² a całkowite usunięcie materii organicznej (TOC) zostało kontrolowane za pomocą metody UV przy $\lambda=254$ nm. W wyniku dodatku NFT istotnie zmniejszyła się ilość najbardziej rozpowszechnionych szczepów kosztem zwiększonej bioróżnorodności (identyfikacja szczepów z pobranego DNA - analiza iTag z sekwen. genów 16S rRNA; analiza profilu społeczności bakteryjnych – sekwen. metagenomiczne nowej generacji mNGS), a zatem kosztem zmiany struktury konsorcjów, niezależnie od miejsca pobranej próbki środowiskowej, co klarownie zostało pokazane na Fig. 4

w pracy **P3**. Ustalono, że szybkość degradacji NFT była odwrotnie proporcjonalna do zwiększającej się ilości NFT działającej na społeczność drobnoustrojów. Przy początkowym stężeniu $c=20$ mg NFT/L końcowa wydajność degradacji przez konsorcjum bakteryjne NW była wyższa niż dla próbki bakterii oznaczonej jako SS (odpowiednio biodegradacja 88% i 64%). **Przyznam szczerze, że po zapoznaniu się z faktem, że informacja dotycząca produktów biotransformacji SEM i HYD ukazała się w literaturze po raz pierwszy w pracy P3, byłem zaskoczony bo właśnie takich produktów degradacji chemik by oczekiwał mając na uwadze strukturę NFT.** Docenić trzeba jednak, że zostało to wykazane eksperymentalnie z udziałem NBA i że wyniki są przekonujące ukazując duży wpływ obecności NFT na mikrobiomy wodne. Bazując na zmianach w składzie konsorcjów (proporcjach zawartości pojedynczych szczepów w konsorcjach) po podaniu NFT Doktorantka analizując z pomocą współpracowników α i β różnorodność wywnioskowała, że za biodegradację NFT w konsorcjum NW odpowiada głównie szczepy *Xanthomonadaceae* w przeciwieństwie do szczepów *Pseudomonadaceae*, którego ilość zauważalnie została ograniczona po podaniu antybiotyku. Z kolei w próbkach konsorcjum SS, szczepy *Proteobacteria* (*Gammaproteobacteria*) były tymi o największej abundancji i prawdopodobnie głównie odpowiadały za rozkład NFT. W pracy sformułowano ciekawy wniosek, że zwiększenie bioróżnorodności konsorcjów bakteryjnych nie musi być związane z wzrostem funkcjonalności czyli zdolnością do biodegradacji ksenobiotyków.

W pracy **P5** Doktorantka kontynuowała temat oceny biodegradacji NFT przez trzy nowe wyizolowane szczepy bakteryjne (2 z zanieczyszczonej gleby i jeden z próbki wodnej) gdzie do badań włączyła metody AFM (mikroskopia sił atomowych) i FC (przepływowa cytometria) i wyznaczenie parametrów takich jak potencjał elektrokinetyczny zeta (ZP), wielkości cząstek (PS) czy indeks polidispersyjności (Pdl). Wyizolowane szczepy zostały scharakteryzowane, m.in. przez analizę w programie MEGA-X (drzewa filogenetyczne) i zdeponowane w *GenBank*. Żeby ocenić różnice w kształcie komórek poddanych działaniu NFT użyto metody AFM podczas gdy wyznaczenie potencjału zeta i rozkładu wielkości cząstek miało na celu zweryfikowanie stabilności zawiesin drobnoustrojów podczas degradacji. Degradację NFT pod wpływem bakterii kontrolowano metodą LC/MS² z derywatyzacją z NBA, która wykazała podobne produkty biodekompozycji jak w pracy **P3**. Wpływ na komórki bakteryjne zarówno NFT jak i jego metabolitów oceniano pod kątem całkowitej przepuszczalności membranowej, względnej

cytotoksyczności i aktywności metabolicznej. Ustalono, że najefektywniejszymi bakteriami w usuwaniu NFT były te szczepu *Serratia marcescens* ODW152, gdzie zaobserwowano wysoki stopień biodegradacji (96 % w czasie 28 dni). Istotne różnice przed i po 28 dniach od zaaplikowania NFT zaobserwowano w kształcie (długości, szerokości) i „chropowatości powierzchni” komórek bakteryjnych szczególnie w przypadku tych mniej aktywnych w biodegradacji szczepów, podczas gdy zmiany w strukturze komórek najaktywniejszego w biodegradacji szczepu *Serratia marcescens* ODW152 były bardziej ograniczone. Wszystkie szczepy wykazały ujemną wartość potencjału zeta, przy czym szczepy traktowane NFT wykazały niższą wartość ZP (w t=7 dni od podania NFT). W tym miejscu również najmniejsze zmiany potencjału i wartość potencjału ZP wykazano dla najaktywniejszego w biodegradacji NFT szczepu *Serratia marcescens* ODW152. Dalej wykazano, że monodispersyjność zawiesin bakteryjnych wzrastała z czasem inkubacji zarówno bez NFT jak i z NFT. Podobnie dla wyizolowanych szczepów aktywność metaboliczna i przepuszczalność błonowa spadały dla szczepów z NFT względem tych nie poddanych działaniu ksenobiotyku.

Praca **P2** poświęcona z kolei została analizie **długoterminowego wpływu (przez 12-miesiący)** obecności NFT i FTD (furaltadonu) na cechy trzech wyizolowanych szczepów bakterii: *Sphingobacterium caeni* FTD2, *Achromobacter xylosoxidans* NFZ2 i *Pseudomonas hibiscicola* FZD2. **Na samym wstępie nasuwa się pytanie, który z enancjomerów furaltadonu (FTD) był poddany badaniom biodegradacji bo jak można oczekiwać metabolizm mikroorganizmów (oparty na działaniu m.in. enzymów) obu z enancjomerów może się nieco różnić? Czy dostępne są ogólne informacje w literaturze (lub może Doktorantka je posiada) odnośnie profilu działania enancjomerów FTD na różne szczepy bakteryjne?** Podczas określania wpływu długoterminowego działania w/w antybiotyków wykorzystano analizę podobnych fizykochemicznych i strukturalnych parametrów komórek, podobnie jak w pracach dotyczących krótkoterminowego działania ksenobiotyków, oraz zastosowano inne metody jak TEM (*Transmission Electron Microscopy*), które ujawniły zmianę szerokości komórek bakteryjnych, utratę otoczki, dezintegrację i zmniejszenie grubości ścian komórkowych, niejednorodną postać cytoplazmy itp. **W tym miejscu rozpatrując tak daleko idące zmiany w strukturze komórek bakteryjnych pojawia się pytanie odnośnie aparatu biosyntetycznego białek - czyli rybosomów – czy rybosomy w tak zmienionych komórkach bakteryjnych**

utrzymały swoje funkcje? Czy był monitorowany poziom ekspresji różnych kluczowych białek regulatorowych lub strukturalnych (np. białka Ftsz) w analizowanych komórkach bakteryjnych? Zmiany w przepuszczalności błonowej całkowitej (TMP) i wewnętrznej (IMP) były zróżnicowane i zależne od typu ksenobiotyku i rodzaju szczepu bakteryjnego. **Jeżeli w komórkach bakteryjnych doszło do tak istotnych zmian w układzie transportu przez błonę to czy np. operon laktozowy u bakterii został istotnie zaktywowany czy też może wyłączony?** Doktorantka również zauważyła różnice w we właściwościach nanomechanicznych takich jak siły adhezji (energii) w kontrolowanych bakteryjnych próbkach, przy czym te były większe w próbkach z NFT i FTD – największe dla szczepów z dodatkiem NFT. Stwierdziła także właściwie, że na wynik podwyższonej adhezji mógł mieć wpływ wyciek cytoplazmy niekoniecznie spowodowany ksenobiotykami ale też mechaniczna ingerencja w komórkę przy zastosowaniu metody AFM. Należy zauważyć, że zastosowane metody mikroskopii elektronowej i mikroskopii sił atomowych ujawniły istotne zmiany morfologiczne wywołane 12-miesięczną ekspozycją bakterii na obecność NFT lub FTD. Ogólnie Doktorantka skonkludowała tę część badań, że szczep *Pseudomonas hibiscicola* FZD2 był najbardziej podatny, podczas gdy szczep *Sphingobacterium caeni* FTD2 okazał się bardziej odpornym szczepem na długoterminowy wpływ destrukcyjny działania antybiotyków.

W pracy P4, był badany długoterminowy wpływ NFT i FTD na profil metabolomiczny, zaburzoną syntezę białek, efekty mutagenne i zwiększenie stresu oksydacyjnego izolowanych i scharakteryzowanych szczepów bakteryjnych (*Sphingobacterium siyangense* FTD2, *Archomobacter pulmonis* NFZ2 i *Stenotrophomonas maltophilia* FZD2 – zdeponowane dane w *GenBank*), dla których przeprowadzono sekwencjonowanie genomu, ustalenie drzew filogenetycznych i określenie /identyfikację/ klastrów genowych odp. za powstawanie drugorzędowych metabolitów. Analiza PCA (*Principal Component Analysis*) wskazała, że ścieżkami metabolicznymi, które zostały zmienione pod wpływem długotrwałego działania NFT i FDA na szczepy były te dotyczące wybranych aminokwasów: Ala, Asp, Glu, Phe, Tyr, Trp, Arg i Pro, cukrów glukozy i galaktozy, biosyntezy aminoacylo-tRNA (aa-tRNA) i szlaku biosyntezy nowobiocyny. Zaznaczyć trzeba tutaj, że wpływ FTD i NFT był porównywalny w poszczególnych szczepach na zmienione szlaki metaboliczne. Najbardziej zmienionymi biosyntetycznymi procesami były te dotyczące metabolizmu aminokwasów i cukrów oraz

biosyntezy aa-tRNA. Ogólnie rzecz biorąc zaobserwowano zmniejszoną akumulację aminokwasów w komórkach potraktowanych NFT i FTD (z małymi wyjątkami). W pracy analizowano również aktywność glutationowych S-transferaz (GST), które uaktywniają się w metabolizmie wtórnym bakterii w celach neutralizacji szkodliwych metabolitów. Największy wzrost aktywności transferaz GST zaobserwowano dla szczepu *Stenotrophomonas maltophilia*, podczas gdy dalsze badania z udziałem katalazy (CAT), dysmutazy nadtlenczkowej (SOD) i peroksydaz lipidowych (LPX) wykazały wyraźnie zwiększenie stresu oksydacyjnego w komórkach bakteryjnych pod wpływem długotrwałego oddziaływania ksenobiotyków. **W tym miejscu nasuwa się pytanie odnośnie reaktywności takiej transferazy GST w kontekście struktury analizowanych ksenobiotyków (czy Doktorantka mogłaby coś na ten temat powiedzieć)?** Badania z udziałem sensorów DNA i RAPD-PCR wykazały mutageny wpływ nitrofuranów (utlenienie guaniny – 8-okso-G), co szczególnie widoczne było dla testów ze szczepem *Stenotrophomonas maltophilia* i FTD. Ogólnie praca ta jest udaną próbą „wglądu” w funkcjonowanie metaboliczne komórek bakteryjnych pod wpływem długotrwałej ekspozycji na nitrofurany, przy czym wpływ nitrofuranów na bakterie zdaje się wynikać bardziej z profilu danego szczepu niż z obecności konkretnego ksenobiotyku.

Publikacje podstawowe zostały uzupełnione pracami **S1-S3**, które dotyczą odpowiednio: kinetycznych rozważań tj. ustalenia tzw. ‘half-time’ eliminacji nitrofuranów z komórek bakteryjnych ($t^{1/2} = 104 - 327$ h), fotodegradacji nitrofuranów w obecności fotokatalizatorów (usunięcia ze środowiska wodnego w obecności układu TiO₂-P25) i wpływu synergistycznego oddziaływań saponinowych surfaktantów na aktywność przeciwbakteryjną NFT.

Ocena dotycząca dorobku naukowego i organizacyjnego Doktorantki (dane bibliometryczne)

Do dysertacji w formie “spinki” Doktorantka załączyła pięć publikacji (**P1-P5**) z bazy JCR opublikowanych w czasopiśmie takich jak: (**P1**) *International Journal of Environmental Research and Public Health* **2019**, *16*, 1526 (MDPI, IF=2.849, 70 pkt^{MEiN}, Q2, 75 percentyl^{Scopus}), (**P2**) *Journal of Hazardous Materials* **2021**, *407*, 124352 (Elsevier, IF=14.224, 200 pkt^{MEiN}, Q1, 97 percentyl^{Scopus}), (**P3**) *Environmental Research* **2023**, *2016*, 114531 (Elsevier, IF=8.431, 100 pkt^{MEiN}, Q1, 91 percentyl^{Scopus}), (**P4**) *Science of The Total Environment* **2023**, *872*, 162199 (Elsevier, IF=10.753, 200 pkt^{MEiN}, Q1, 96 percentyl^{Scopus}), (**P5**) *Science of The Total*

Environment **2023**, 874, 162422 (Elsevier, IF=10.753, 200 pkt^{MEiN}, Q1, 96 percentyl^{Scopus}), gdzie we wszystkich była pierwszą autorką (!), w publikacji P2 była autorką współkorespondującą z prof. Kaczorek a w pracach P3, P4 i P5 była samodzielną autorką odpowiedzialną za korespondencję (!). Nie mniejsze wrażenie sprawia całkowity dorobek naukowy mgr. inż. Amandy Pacholak na który, oprócz wspomnianych powyżej prac, składa się 18 innych publikacji z bazy JCR (w sumie 23 prace w latach 2017-2023 czyli powyżej 3 prac/rok), opublikowanych w przeważającej ilości może już w nie tak prestiżowych ale w dobrych czasopismach specjalistycznych (jak m.in. *J. Mol. Liquids*, *Chemosphere* etc.). W sumie w 13 publikacjach z 23 Doktorantka była pierwszą autorką (!) co należy uznać za wynik wyróżniający i wskazujący na duży potencjał naukowy realizowany w pracy zespołowej. Doktorantka wykazała się międzynarodową mobilnością i odbyła zagraniczne pobyty naukowe w: *The Ohio State University*, USA – 4 miesiące (2021 r.), *University of Technology Sydney*, Australia – 1 miesiąc (2019 r.), *University of Helsinki*, Finlandia - 8 dni (szkoła letnia w 2019 r.) i w *Beijing University of Technology*, Chiny - 3 miesiące (2018 r). Doktorantka była Autorką wielu wystąpień na konferencjach krajowych i międzynarodowych (komunikaty 10międzynarodowe+7krajowe=17 i postery 9międzynarodowe +15krajowe =24) a także posiada doświadczenie organizacyjne (członek komitetu organizacyjnego serii konferencji krajowych - *Ogólnopolskie Sympozja Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów „BioOrg”* w latach 2015, 2017, 2019, 2022). Trochę szkoda, że Doktorantka nie przedstawiła dokładnych informacji dotyczących udziału w konferencjach (tylko liczbowo) co umożliwiłoby stwierdzenie czy są one znaczące w świetle uprawianej przez nią tematyki badawczej. Innym, mocnym punktem cv Doktorantki i dowodem dużej aktywności naukowej jest jej udział w projektach badawczych na przestrzeni lat 2017-2023 (udział w 13-tu projektach), co wydaje się wręcz niemożliwe czasowo ... ale nie dla mgr. inż. Amandy Pacholak... Warto podkreślić, że Doktorantka nie tylko brała udział w tych projektach w charakterze wykonawcy ale też kierowała ważnym projektem NCN dla młodych badaczy - **Preludium 15 nr. 2018/29N/NZ9/01532** i dwoma subsydiami na **Politechnice Poznańskiej**. Nie jest więc zaskoczeniem, że tak duża aktywność naukowa Doktorantki została już doceniona przez różne fundacje jak np. FNP (stypendium START w 2022 r.) czy stypendium Fundacji Kościuszki (2021 r. – na pobyt w USA). Mgr. inż. Amanda Pacholak otrzymała nagrody na konferencjach zagranicznych za wygłoszone prezentacje i

stypendium Rektora PP dla doktorantów. **Podsumowując, jak na ten etap kariery Doktorantki jej dorobek naukowy i towarzyszące osiągnięcia w kryteriach ilościowym i jakościowym przedstawiają się wyróżniająco i bardzo obiecująco w perspektywie dalszego dynamicznego rozwoju naukowego.**

Konkluzja

Uważam, że tematyka pracy jest bardzo interesująca i ważna, część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana (z dużą świadomością wagi tematu – dobry wstęp teoretyczny z bogatą i aktualną literaturą) i wykonana co doprowadziło do przekonujących wniosków ukazujących realny wpływ obecności syntetycznych antybiotyków nitrofuranowych na mikroorganizmy środowiskowe ale i z drugiej strony wskazało szansę zastosowania różnych szczepów bakteryjnych do rozkładania tego typu antybiotyków w celach bioremediacji. Stwierdzam, że przedłożona do oceny dysertacja, oparta na cyklu 5-ciu oryginalnych artykułów naukowych **P1-P5** opublikowanych w czasopiśmie z bazy *JCR*, **spełnia ustawowe i zwyczajowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim.** Zatem wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemicznej Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej **o dopuszczenie mgr inż. Amandy Pacholak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora** w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie chemia.

Zważywszy na poniższe fakty:

1) przedstawienia tak wielokierunkowej analizy biomateriałowej z wykorzystaniem szeregu nowoczesnych metod prowadzącej do poczynienia szeregu istotnych konkluzji odnośnie, gdzie Doktorantka była wiodącym autorem eksperymentalnym (we wszystkich pracach **P1-P5** pierwsza autorka) ale i też pełniła rolę autora korespondencyjnego* (w pracach **P2**/współkorespondujący z prof. E. Kaczorek/; w **P3, P4 i P5** /samodzielna korespond./).

2) opublikowania wysoko cyklu prac **P1-P5** z dysertacji [3 prace za 200 pkt MEiN, (Q1); 1 praca za 100 pkt MEiN, (Q1); 1 praca za 70 pkt. MEiN (Q2); **gdzie średni IF >9**] oraz całkowity dorobek naukowy mgr. inż. Amandy Pacholak obejmuje 23 publikacje z bazy *JCR* gdzie w 13-tu była pierwszą Autorką;

3) Dużej mobilności Doktorantki – 4 wyjazdy naukowe zagraniczne (stypendia fundacji) i uczestniczenia przez nią w realizacji aż 13-tu projektów, gdzie m.in. w projekcie NCN - **Preludium 15 nr. 2018/29N/NZ9/01532** była kierowniczką projektu;

rozważyłbym, jeżeli jest to możliwe z powodów proceduralnych (czas realizacji doktoratu > 4 lat ale w tym 4 wyjazdy zagraniczne), wyróżnienie dysertacji mgr. inż. Amandy Pacholak.

