



Lublin, 10.08.2020 r.

dr hab. Jolanta Jaroszuk-Ścisieł, prof. UMCS
Zakład Mikrobiologii Środowiskowej
Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19
20-033 Lublin

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Anny Dzionek
pt. „Wpływ immobilizacji komórek bakteryjnych na biodegradację naproksenu”,
wykonanej w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Wydziale Nauk Przyrodniczych,
Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach
pod kierunkiem dr hab. Urszuli Guzik, prof. UŚ

Oceniana rozprawa doktorska przedstawia bardzo wartościowe wyniki badań o charakterze aplikacyjnym i podstawowym uzyskane dzięki wyjątkowo umiejętnemu kontynuowaniu badań promotora pracy dr hab. Urszuli Guzik, prof. UŚ w dziedzinie degradacji wielopierścieniowych niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NSLPZ). Rozprawa doktorska mgr Anny Dzionek stanowi doskonały przykład wykorzystania dokonań zespołu oraz wcześniej wyizolowanych ze środowiska i wyselekcjonowanych szczepów o dużej efektywności degradacyjnej. Badania przeprowadzone na modelu szczepów, dla których opracowane zostały szlaki rozkładu naproksenu i określone aktywności enzymatyczne, pozwoliły na opracowanie nowej, wydajnej technologii stosowania szczepów degradujących naproksen, a jednocześnie na określenie efektywności ich działania zarówno w monokulturze jak i w warunkach ich współdziałania z mikrobiomem środowiska naturalnego silnie zanieczyszczonego różnorodnymi ksenobiotykami występującymi w wysokim stężeniu.

Wśród niesteroidowych leków przeciwzapalnych naproksen jest jednym z najbardziej zagrażających środowisku naturalnemu ze względu na niecałkowitą degradację w organizmie człowieka i trudności utylizacji w oczyszczalniach ścieków.

Ocena układu rozprawy doktorskiej i formalnej strony

Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Dzionek przygotowana została jako **cykl czterech prac**, jednej przeglądowej i trzech doświadczalnych, opublikowanych w latach 2016, 2018 i 2020.

Podkreślić należy, że wszystkie prace składające się na cykl zostały opublikowane w renomowanych czasopismach z listy JCR o wysokich współczynnikach wpływu oraz dużej liczbie punktów MNiSW. Sumaryczna wartość współczynnika IF dla tych prac wyniosła ok. 13 (średni IF=3,24). Praca przeglądowa opublikowana została w 2016 roku w czasopiśmie *Electronic Journal of Biotechnology* (IF=2,894, 70 pkt MNiSW), dwie prace doświadczalne w 2018 roku w *Catalysts* (IF=3,27, 100 pkt MNiSW), a ostatnia w cyklu publikacja ukazała się w 2020 roku w *Molecules* (IF=3,52, 100 pkt MNiSW).

We wszystkich publikacjach składających się na cykl, będący podstawą rozprawy, Doktorantka jest pierwszym autorem, a ponadto zgodnie z zamieszczonymi oświadczeniami, miała Ona bardzo duży (od 70 aż do 85% - średnio 80%) udział w tworzeniu tych publikacji. We wszystkich pracach recenzowanego cyklu mgr Anna Dzionek zarówno projektowała jak i wykonywała doświadczenia, analizowała wyniki i opracowywała manuskrypt, co świadczy o bardzo dużym zaangażowaniu i samodzielności Autorki. Jednocześnie skład autorski tych publikacji wskazuje na duże wsparcie i współdziałanie zespołu badawczego w realizacji badań, których wyniki zawarte są w niniejszej rozprawie doktorskiej. Autorem korespondencyjnym trzech prac cyklu jest promotor dr hab. Urszula



Guzik, prof. UŚ, a jednej pracy doświadczalnej dr hab. Danuta Wojcieszńska, prof. UŚ. Wysoka jakość pracy przeglądowej opublikowanej w 2016 roku wskazuje na bardzo dużą wiedzę Doktorantki i zainteresowanie tematem, a zarazem na doświadczenie oraz wysokie umiejętności zespołu autorów w pisaniu tego typu prac. Dogłębnie opracowany i przedstawiony w publikacji „Natural carriers in bioremediation: A review” temat metod bioremediacji oraz znaczenia immobilizacji i sposobów jej przeprowadzania dał świetną podstawę do planowania doświadczeń, ich walidacji i rzetelnego wykonania. Otworzyło to drogę poszukiwania nowych rozwiązań za pomocą właściwie dobranej warsztatu badawczego i zaowocowało spektakularnymi wynikami. Publikacje składające się na cykl, są bardzo dobrze i starannie przygotowane, zawierają przejrzystą, właściwie dobraną do prezentowania określonego typu wyników dokumentację graficzną, w tym dokumentację fotograficzną uzyskaną dzięki zastosowaniu mikroskopii elektronowej skaningowej (SEM) zastosowaną do zobrazowania immobilizacji komórek bakteryjnych na powierzchni testowanych nośników.

Podobnie wysoką jakością jak publikacje odznacza się autoreferat i jego streszczenie. Autorka potrafiła w bardzo przystępnej, syntetycznej formie przedstawić całość zagadnienia, naświetlić cele i przebieg badań oraz podkreślić ważność uzyskanych wyników, wskazując na wkład w badania podstawowe jak i w rozwój technologii bioremediacji opartej na immobilizacji mikroorganizmów. Dokumentacja zawarta w publikacjach objęła 2 schematy, 3 rysunki przedstawiające zdjęcia mikroskopowe SEM i 2 rysunki ze zdjęciami makroskopowymi obrazującymi nośniki, żele ukazujące profil bakteryjnych regionów V3-V5 i grzybowych regionów ITS1/2, 11 tabel oraz 8 wykresów, uzupełnionych w autoreferacie o materiał dodatkowy - bardzo szczegółowe wyniki zaprezentowane w postaci wykresów przedstawiających wpływ czynników środowiskowych i fizjologicznych na efektywność immobilizacji komórek *Planococcus* sp. (*Catalysts* 2018) oraz komórek *Bacillus thuringensis* (*Molecules* 2020). Cały materiał graficzny został wyraźnie opisany, a większość zawartych w nim wyników została dokładnie przeanalizowana statystycznie dla podkreślenia istotności ich różnic.

W autoreferacie Doktorantka zacytowała 41 publikacji, w tym powołała się na 5 publikacji autorstwa zespołu Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego.

Przegląd wiedzy zaprezentowany w publikacji przeglądowej został przeprowadzony na podstawie 132 wartościowych, dobrze dobranych publikacji. W kolejnych pracach doświadczalnych Doktorantka odwołała się, odpowiednio, do 61, 59 i 34 publikacji.

Układ rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Dzionek jest zgodny z normami przyjętymi dla tego typu opracowań, a na podkreślenie zasługuje bardzo duża syntetyczność, systematyczność i przejrzystość wynikająca z właściwie przyjętej koncepcji przygotowania rozprawy.

Recenzowana rozprawa doktorska składa się z sześciu rozdziałów: (I) autoreferatu, (II) cyklu publikacji wchodzących w skład rozprawy, (III) podsumowania, (IV i V) streszczeń w języku polskim i angielskim oraz (VI) oświadczeń współautorów.

Stanowiący pierwszy rozdział Autoreferat, liczący 18 stron, złożony jest z pięciu podrozdziałów: (I.1) wprowadzenia, (I.2) celu, (I.3) materiałów i metod, (I.4) wyników i dyskusji oraz (I.5) spisu literatury. W podrozdziale I.1. Wprowadzenie autorka podkreśla, że naproksen (2-(6-metonksynaftalen-2-yl)propanowy należy do trudno degradablealnych niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) o chronicznym oddziaływaniu, przy czym ulega on fototransformacji, a produkty fotodegradacji są bardziej toksyczne niż sam lek. Remedium na to zagrożenie mogą być szczepy mikroorganizmów, które można wykorzystać w procesie bioaugmentacji. Dobrymi kandydatami do przeprowadzania tego procesu są szczepy z kolekcji Zakładu Biochemii i Genetyki Mikroorganizmów: *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) oraz *Planococcus* sp. S5, które mogłyby sprawdzić się w tej roli w oczyszczalniach ścieków, gdyby zdołały skolonizować naturalny system i namnożyć się w nim. Sposobem na podniesienie efektywności kolonizacji i namnażania może być immobilizacja prowadząca do wytworzenia biofilmu. Doktorantka bardzo słusznie podkreśliła znaczenie tworzenia biofilmu dostrzegając, że w optymalnych warunkach biofilm może przyczynić się do zwiększenia efektu bioremediacji, ale z drugiej strony, biofilm może powodować ograniczenie dyfuzji i osłabienie możliwości katalitycznych, a nawet zmianę szlaków metabolicznych. Autorka zauważa, że rodzaj



materiału, z jakiego wykonany jest nośnik wpływa na proces adhezji, który kształtują oddziaływania elektrostatyczne, hydrofobowe oraz interakcje wynikające z topografii powierzchni, obecności grup funkcyjnych oraz adsorpcji na powierzchni.

Doktorantka wytyczyła nadrzędny **cel rozprawy doktorskiej** - zbadanie wpływu immobilizacji szczepów mikroorganizmów zdolnych do degradacji NLPZ na kinetykę ich rozkładu przyjmując jako modelowy NLPZ naproksen. Autorka obok badania kinetyki rozkładu w warunkach monokulturowych postawiła sobie także za cel zbadanie konkurencyjności zimmobilizowanych komórek w obecności autochtonicznych mikroorganizmów systemu bioremediacyjnego.

Doktorantka wytyczyła także bardzo ważne **cele szczegółowe**, jak: (1) scharakteryzowanie biofilmu pod względem metabolicznym, (2) zoptymalizowanie warunków immobilizacji; (3) scharakteryzowanie nośnika oraz unieruchomionych mikroorganizmów, (4) opracowanie modelu rozkładu naproksenu przez immobilizowane szczepy bakteryjne (5) określenie wpływu na rozkład naproksenu (5.1): immobilizacji w monokulturze, (5.2) wprowadzenia zimmobilizowanych mikroorganizmów do złoża biologicznego.

Dążąc do osiągnięcia postawionych celów Doktorantka wykorzystwała szereg nowoczesnych narzędzi badawczych oraz metod bardzo dobrze dobranych i zmodyfikowanych na potrzeby badań własnych.

W badaniach użyto: (A) dwa szczepy bakteryjne: (1) *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) i (2) *Planococcus* sp. S5 oraz (B) dwa nośniki służące do immobilizacji komórek bakteryjnych metodą adsorpcji na powierzchni: (1) piankę poliuretanową (PUR; Instapak®, Charlotte, NY, USA) o wymiarach 1 x 1 x 1 cm i masie 10 ± 5 mg oraz (2) gąbkę Loofah (York, Bolechowo, Poland) o masie 150 mg.

Dokonano charakterystyki zastosowanych nośników oraz utworzonych na jego powierzchni biofilmów bakteryjnych. Ustalono wpływ unieruchamiania na przebieg rozkładu leku w warunkach monokulturowych, a także w obecności autochtonicznego mikrobiomu złoża biologicznego. Ponadto zbadano zmiany aktywności enzymów zaangażowanych w rozkład naproksenu przez immobilizowane komórki. Badania nad wpływem immobilizacji na biodegradację naproksenu rozpoczęto przeprowadzeniem optymalizacji procesu unieruchamiania. Stan fizjologiczny i charakterystykę metaboliczną immobilizowanych bakterii w biofilmie określono dzięki modyfikacji (według Liang i in. 2009) metody z zastosowaniem diocjanu fluoresceiny pozwalającej ominąć odrywanie biofilmu od nośnika i przeprowadzenie testu na nienaruszonym biofilmie wraz z nośnikiem. W testach adsorpcji fluoresceiny przez nośnik oraz autohydrolizy diocjanu fluoresceiny zoptymalizowano sposób aplikacji diocjanu fluoresceiny, prędkość wytrząsania, pH buforu fosforanowego oraz czas inkubacji. Opracowana procedura zakładająca wytrząsanie próbek w buforze fosforanowym o pH w zakresie 7,4-7,6 przez 1 godzinę pozwalało uzyskać wynik wyrażany jako całkowita aktywność metaboliczna (TEA). Analiza czułości testu, w trakcie której mierzono zmiany TEA w wyniku głodzenia pozwoliła wyznaczyć minimalny endogenny metabolizm szczepu *Bacillus thuringiensis* B1(2015b). Zaobserwowano również, że niedobór substancji odżywczych indukuje na powierzchni pianki poliuretanowej proces tworzenia biofilmu przez komórki szczepu B1(2015b). Walidację metody przeprowadzono przez porównanie uzyskanych wyników z wynikami pomiaru zużycia tlenu (OUR, ang. *Oxygen Uptake Rate*) przez immobilizowane bakterie wraz z nośnikiem. Ocenę zmian strukturalnych biofilmu poddanego procesowi głodzenia przeprowadzono w skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM). Modele rozkładu naproksenu przez immobilizowane szczepy bakteryjne określano w testach kometabolicznej biodegradacji na pożywkę MSM uzupełnionej naproksenem w czterech stężeniach (6, 9, 12 lub 15 mg/L), a co 3 dni glukozą w jednym stężeniu (0,5 g/L). Porównywano 15-dniowe hodowle komórek szczepu S5 immobilizowane na gąbce Loofah oraz 15 i 35-dniowe hodowle nieimmobilizowane na podłożu MSM suplementowanym glukozą (0,5 g/L) oraz naproksenem (6 mg/L). Określono aktywność pięciu enzymów zaangażowanych w rozkład naproksenu: O-demetylazy, monooksygenazy aromatycznej, dioksygenazy naftalenowej, dioksygenazy 1,2-gentyzynianowej oraz dioksygenazy 1,2-salicylowej. Rozkład naproksenu przez immobilizowane mikroorganizmy badano w systemie bioremediacyjnym na specjalnie skonstruowanych złożach biologicznych, z których każde składało się



z czterech ruchomych podjednostek o wymiarach 400 x 100 mm, aby możliwe było wprowadzenie immobilizowanych na gąbce Loofah bakterii B1(2015b) na różnych wysokościach systemu. Błone biologiczną kształtowano na złożu biologicznym dzięki augmentacji autochtonicznymi mikroorganizmami pochodzącymi z komory przepływowej osadnika Imhoff'a w Krupskim Młynie – Ziętek. Po 21 dniach do złóż wprowadzono immobilizowane na gąbce Loofah komórki B1(2015b) na różnych wysokościach systemu. Określano także wpływ immobilizowanych komórek na autochtoniczny mikrobiom systemu bioremediacyjnego izolując DNA z próbek błony biologicznej oraz gąbek Loofah oraz amplifikując metodą PCR region V3-V5 bakteryjnego genu 16S rRNA i region ITS1/ITS2 eukariotycznego genu rRNA. Dokonano rozdziału uzyskanych fragmentów DNA poprzez elektroforezę w gradiencie czynnika denaturującego (DGGE) oraz poddano sekwencjonowaniu. Na podstawie analizy intensywności prążków DNA na żelach DGGE wyliczono indeks Shannon'a-Wiener'a (H') obrazujący różnorodność mikrobiologiczną populacji. Badania nad modyfikacją testu przeprowadzono na immobilizowanych na piance poliuretanowej (PUR) komórkach szczepu *Bacillus thuringiensis* B1(2015b). Porównując wartości TEA komórek unieruchomionych B1(2015b) oraz wolnych, inkubowanych w tych samych warunkach, zaobserwowano, że immobilizacja ogranicza niekorzystny wpływ głodzenia na komórki. Wykazano za pomocą SEM pozytywny wpływ głodzenia na proces tworzenia biofilmu. Autorka w oparciu o dane literaturowe wyjaśniła, że niedobór substancji odżywczych indukując sporulację promował proces produkcji egzopolisacharydów.

Zaobserwowano bardzo wysoką korelację trendu spadku TEA oraz OUR podczas eksperymentu, co świadczyło o wiarygodności opracowanej metody.

Szczepy *Planococcus* sp. S5 i *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) różniły się znacznie optymalnymi dla immobilizacji na gąbce Loofah wartościami okresu inkubacji (odpowiednio 72 i 48 godzin), pH (7,2 i 8,0), temperatury (30°C i 20°C), czy tempa wytrząsania (90 i 110 rpm), przy czym szczep *Planococcus* odznaczał się niemal dwukrotnie wyższą aktywnością metaboliczną TEA niż szczep *Bacillus thuringiensis* B1. Analiza rozkładu naproksenu przez szczep *Planococcus* sp. S5 wykazała działanie hamujące leku w stężeniu wyższym niż 12 mg/L na wolne komórki tego szczepu, które były zdolne do całkowitego rozkładu leku w stężeniu 6, 9 oraz 12 mg/L, odpowiednio, w czasie 38, 44 oraz 62 dni.

Rozkład naproksenu przebiegał w dwóch fazach: pierwszej 29-dniowej oraz drugiej o dwukrotnie szybszym rozkładzie leku. Aktywność enzymatyczna w I fazie rozkładu leku przez wolne komórki S5 była znacznie niższa niż w fazie szybszego rozkładu. Immobilizowane na gąbce Loofah komórki S5 były zdolne do całkowitej degradacji leku we wszystkich analizowanych stężeniach, a tempo rozkładu było stałe, niezależne od dnia inkubacji oraz zbliżone do szybkości degradacji w trakcie II fazy przeprowadzanej przez komórki wolne. Komórki *Planococcus* sp. S5 zachowały pełną zdolność degradacyjną przez 55 dni, a zwiększone wydzielanie egzopolisacharydów wzmacniało barierę ochronną przed naproksenem. Pomimo zbliżonego tempa degradacji leku przez wolne komórki S5 w II fazie oraz przez immobilizowane komórki S5, aktywność analizowanych enzymów komórek immobilizowanych była znacznie wyższa niż wolnych komórek. Dzięki immobilizacji, czas rozkładu naproksenu przez szczep S5 został niemal dwukrotnie skrócony. Wykazano również niższą wrażliwość unieruchomionych komórek S5 na lek, co skutkowało całkowitym rozkładem najwyższej analizowanej dawki leku.

Przebieg biodegradacji naproksenu przez immobilizowane na gąbce Loofah komórki szczepu *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) monitorowano w złożu biologicznym augmentowanym autochtonicznymi mikroorganizmami. Immobilizowane komórki *B. thuringiensis* B1(2015b) zdegradowały 70% naproksenu w stężeniu 1 mg/L w nieaugmentowanym złożu biologicznym, a w obecności autochtonicznego mikrobiomu aż 90% leku.

Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić zachodzenie podczas rozkładu naproksenu słabo poznanych dotąd synergistycznych oddziaływań pomiędzy wprowadzonymi immobilizowanymi komórkami szczepu *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) a autochtonicznymi mikroorganizmami złoża biologicznego. Autorka trafnie wymieniła kilka możliwych przyczyn synergistycznego oddziaływania takich, jak: produkcja biosurfaktantów zwiększająca biodostępność zanieczyszczeń, wykorzystywanie



metabolitów nie ulegających transformacji, wymiana czynników wzrostowych, indukcja agregacji, obecność w dolnych partiach złoża biologicznego beztlenowych bakterii z rodzaju *Clostridium* przyspieszających rozkład naproksenu dzięki enzymom demetylującym oraz degradującym kwas weratrowy lub katechol.

Analiza chemicznego zapotrzebowania na tlen (ChZT) złoża biologicznego monitorowana w trakcie badań wykazała znacznie wydajniejszą pracę złoża biologicznego z immobilizowanymi komórkami *B. thuringiensis* B1(2015b) oraz autochtonicznymi niż samego złoża. Obserwowano wzrost bioróżnorodności, zmiany grup dominujących, a także wzrost liczby szczepów wrażliwych na naproksen. Doktorantka wykazała, że naproksen przyczynia się do eliminacji autochtonicznych mikroorganizmów w systemach bioremediacyjnych, ale przyspieszenie degradacji leku skutkuje przywróceniem równowagi tego systemu.

Reasumując recenzowana rozprawa doktorska jest kompleksowym opracowaniem, którego niewątpliwymi osiągnięciami są:

1. Dokonanie modyfikacji i walidacji testu opartego na hydrolizie dioctanu fluoresceiny pozwalającego na ocenę stanu fizjologicznego immobilizowanych komórek w biofilmie bez naruszania jego struktury;
2. Poznanie mechanizmów indukcji biofilmu przez testowane szczepy *Planococcus* sp. S5 oraz *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) dzięki optymalizacji procesu immobilizacji szczepów na gąbce Loofah;
3. Zmniejszenie wrażliwości szczepu na naproksen w wyniku immobilizacji na gąbce Loofah komórek *Planococcus* sp. S5, co pozwoliło na dwukrotne przyspieszenie oraz degradację najwyższego analizowanego stężenia naproksenu, który na wolne komórki S5 wykazywał działanie hamujące;
4. Uzyskanie przez immobilizację na gąbce Loofah pełnej aktywności degradacyjnej szczepu *Planococcus* sp. S5 przez 55 dni;
5. Wykazanie, że degradacja naproksenu przez zimmobilizowane na nośnikach komórki szczepu *Planococcus* sp. S5 odbywała się w szlakach degradacji typowych dla komórek niezimmobilizowanych, natomiast nastąpiły znaczące zmiany aktywności pięciu testowanych enzymów zaangażowanych w rozkład naproksenu (O-demetylasy, monooksygenazy aromatycznej, dioksygenazy naftalenowej, dioksygenazy 1,2-gentyzynianowej oraz dioksygenazy 1,2-salicylowej);
6. Odkrycie, że bioaugmentacja złoża biologicznego immobilizowanymi na gąbce Loofah komórkami *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) skutkowała synergistycznymi oddziaływaniami pomiędzy wprowadzonymi komórkami B1(2015b) a autochtonicznymi mikroorganizmami, co spowodowało znaczące przyspieszenie rozkładu naproksenu w złożu biologicznym;
7. Pod wpływem naproksenu znacząco zmniejszała się bioróżnorodność autochtonicznego mikrobiomu złoża biologicznego.

Na szczególne podkreślenie w rozprawie doktorskiej mgr Anny Dzionek zasługuje:

- Optymalizacja procesu immobilizacji szczepów bakteryjnych degradujących naproksen na nośnikach i jednocześnie walidacja metody badania immobilizacji,
- Opisanie warstwowej budowy biofilmu tworzonego podczas immobilizacji z rozróżnieniem warstwy bakteryjnej i grzybowej,
- Wykazanie zachodzenia w badanych układach zjawiska synergii dzięki zastosowaniu bioaugmentacji złożów biologicznych i trafnemu wyborowi źródła autochtonicznego mikrobiomu - komór przepływowych osadnika,
- Opracowanie modeli rozkładu naproksenu przez immobilizowane komórki.

Wyniki opisane w recenzowanej rozprawie doktorskiej mają znaczący wkład w tworzenie efektywnej techniki bioremediacji metodą bioaugmentacji bakterii glebowych. Są niezwykle istotne z punktu widzenia poznawczego i aplikacyjnego, gdyż otwierają perspektywy praktycznego zastosowania zarówno szczepów jak i dedykowanych im nośników w środowisku naturalnym.

Przy lekturze rozprawy doktorskiej mgr Anny Dzionek nasuwają się też pewne uwagi i pytania:

Na jakiej podstawie dobrano wielkość nośników i dlaczego nie była ona ujednoczona?

Czym uzasadniono wybór zróżnicowanych okresów inkubacji: 15-, 35-dniowych immobilizowanych komórek czy 21-dniowego na złożu?



Czy w preparacie bioremediacyjnym Doktorantka zalecałaby jednoczesne stosowanie obu nośników? Czy raczej należałoby immobilizować oba szczepy na jednym wybranym nośniku?

Zarówno w tytule jak i celu rozprawy doktorskiej brak wyraźnego podkreślenia, jakie szczepy będą immobilizowane. Przydatne byłoby także wprowadzenie dokładniejszej informacji o zastosowanych szczepach wskazującej na ich pochodzenie oraz biotechnologiczny i środowiskowy potencjał także w innych dziedzinach niż degradacja ksenobiotyków.

Wprawdzie Autorka syntetycznie podsumowała badania podkreślając największe osiągnięcia recenzowanej pracy, ale nie sformułowała wniosków. Należałoby we wnioskach wymienić testowany zakres warunków hodowli i immobilizacji oraz sprecyzować wyznaczone optymalne warunki.

W rozprawie zabrakło podrozdziału zawierającego spis prac składających się na cykl będący podstawą rozprawy z opisem danych bibliometrycznych.

Zdecydowanie Autorka nie powinna używać w rozprawie doktorskiej pojęcia „mikroflora” w stosunku do autochtonicznych mikroorganizmów złoza biologicznego czy systemu bioremediacyjnego, a zastąpić je słowami mikroorganizmy, mikrobiota lub mikrobiom.

Niniejsze uwagi, mają charakter marginalny i nie umniejszają zupełnie wartości rozprawy.

Rozprawa doktorska mgr Anna Dzionek prezentuje pełen opis zaawansowanej biotechnologii, która powinna jak najszybciej znaleźć powszechne zastosowanie, aby rozwiązać bardzo aktualny problem skażenia środowiska wielopierścieniowymi związkami niesteroidowymi a zatem daje oryginalne rozwiązanie bardzo istotnego problemu badawczego.

Na wyróżnienie zasługują bardzo dobrze dobrane modele doświadczalne (szczepy, nośniki, źródło autochtonicznego mikrobiomu bioremediacyjnego) oraz techniki doświadczalne, które poddano odpowiednim modyfikacjom. Wysoka jakość opublikowanych prac będących podstawą rozprawy doktorskiej wskazuje, że Doktorantka doskonale opanowała techniki mikrobiologiczne, biochemiczne i molekularne a stosując je w pełni wywiązała się z zadań, jakie zostały postawione w celu pracy.

Recenzowana praca napisana została w sposób wskazujący na dużą wiedzę teoretyczną i praktyczną, dążenie do rozwiązywania problemów o charakterze aplikacyjnym oraz umiejętność interpretacji wyników, ich syntetycznego przedstawienia oraz wnikliwą, twórczą dyskusję.

Rozprawa doktorska mgr Anny Dzionek jest opracowaniem spełniającym wszystkie warunki wymagane odpowiednią ustawą dla dysertacji doktorskich.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Anny Dzionek zatytułowana „**Wpływ immobilizacji komórek bakteryjnych na biodegradację naproksenu**”, stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego oraz **spełnia wymogi** art. 14 ust. 2 pkt 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669), a stopień doktora może być nadany w dziedzinie i dyscyplinie określonej w przepisach wydanych na podstawie art. 5 ust. 3 tej ustawy.

W związku z powyższym, przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach **wniosek o dopuszczenie Pani mgr Anny Dzionek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Jednocześnie, biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom recenzowanej rozprawy, wartość naukową przeprowadzonych badań oraz dorobek naukowy Autorki wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach **o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Anny Dzionek stosowną nagrodą.**

dr hab. Jolanta Jaroszuk-Ścisła, prof. UMCS