



dr hab. Monika Osińska-Jaroszuk  
Katedra Biochemii i Biotechnologii  
Instytut Nauk Biologicznych  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

## **RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**Pani mgr Katarzyny Złotko**  
**wykonanej w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego**  
**Polskiej Akademii Nauk w Lublinie**  
**pt. „Sorpcja metali ciężkich na alfa-glukanach i chitynie”**

Podstawą formalną przygotowania recenzji jest pismo prof. dr hab. Cezarego Sławińskiego Dyrektora Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie z dn. 09 lipca 2021 r z prośbą o sporządzenie oceny rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Złotko pt. „Sorpcja metali ciężkich na alfa-glukanach i chitynie”. Rozprawa doktorska została opracowana pod kierunkiem promotorów: prof. dr hab. Andrzeja Bieganowskiego oraz dr hab. Adama Waśko, prof. Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.



## **1. Celowość podjętej tematyki badawczej**

Stale postępujące zanieczyszczenie środowiska wynikające z ciągłego rozwoju cywilizacyjnego człowieka wymusza poszukiwanie nowych technik przywracania równowagi biologicznej skażonych środowisk. Jedną z takich technologii jest bez wątpienia bioremediacja umożliwiająca usuwanie różnego rodzaju zanieczyszczeń (zarówno organicznych jak i skażeń metalami) przy udziale żywych mikroorganizmów takich jak: bakterie, grzyby czy rośliny. Jedną z odmian bioremediacji jest mykoremediacja wykorzystująca znane od lat zdolności wiązania metali ciężkich przez grzyby poprzez mechanizm biosorpcji lub bioakumulacji. Z kolei entomoremediacja umożliwia sorpcję metali ciężkich z zastosowaniem owadów. W tym kontekście podjęta przez Doktorantkę tematyka wydaje się niezmiernie ciekawa i stanowi uzupełnienie dotychczasowej wiedzy na temat prezentowanych zagadnień. Należy również zwrócić uwagę na fakt, że badanie procesów bioremediacyjnych jest niezwykle złożone, wymaga ogromnej wiedzy i umiejętności posługiwania się różnymi technikami badawczymi. Rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Złotko dotycząca sorpcji metali ciężkich na alfa-glukanach pochodzenia grzybowego i owadziej chitynie znakomicie wpisuje się w ten problem.

## **2. Charakterystyka rozprawy doktorskiej**

Rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Złotko powstała w oparciu o cykl trzech spójnych tematycznie artykułów naukowych (1 pracy przeglądowej i 2 prac oryginalnych) wydanych w latach 2019-2021 w uznanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym: (1) MOLECULES (wydawnictwo MDPI, IF=4.411); (2) INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES (wydawnictwo Elsevier, IF=6.953); (3) POLYMERS (wydawnictwo MDPI, IF=4.329). Sumaryczny współczynnik wpływu (Impact Factor, IF) dla wszystkich trzech czasopism osiągnął wartość 15,693 i jest to w mojej ocenie bardzo dobry wynik. We wszystkich zaprezentowanych publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, a w dwóch z tych prac także autorem korespondencyjnym. Zgodnie z załączonymi oświadczeniami współautorów prac, Jej udział w



powstaniu w/w artykułów jest wiodący i większościowy. Doktorantka uczestniczyła w planowaniu koncepcji badań, samodzielnie wykonywała część pomiarów, opracowywała uzyskane wyniki oraz brała udział w przygotowywaniu manuskryptu. Zaprezentowane prace badawcze zostały poprzedzone autoreferatem, który zawierał kolejno: oświadczenia promotorów i autorki rozprawy, streszczenie w języku polskim i angielskim, teoretyczne wprowadzenie do tematu rozprawy doktorskiej, cel badawczy, materiały i metody zastosowane w badaniach, uzyskane wyniki, wnioski oraz bibliografię. Doktorantka przedstawiła także oświadczenia współautorów publikacji naukowych wchodzących w skład zaprezentowanego cyklu prac. Szkoda jedynie, że Doktorantka nie zamieściła swojego pozostałego dorobku naukowego. W mojej ocenie widoczny jest również brak wskaźników naukometrycznych prezentowanych prac takich jak: Impact Factor czy punktacja MNiSW. Brakuje również przedstawienia procentowego wkładu autorstwa doktorantki w powstanie prac. Nie są to elementy podlegające ocenie prezentowanej pracy ale w sposób wymierny ułatwiają pracę recenzentów. Pomimo tych drobnych uchybień rozprawa doktorska zawiera prawidłowy układ pracy.

Przedstawione do oceny prace stanowią uzupełniającą się całość trzech spójnych tematycznie publikacji dotyczących: „Sorpcji metali ciężkich na alfa-glukanach i chitynie”.

Głównym celem rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Złotko było sprawdzenie zdolności sorpcyjnych naturalnych biopolimerów- grzybowego (1→3)- $\alpha$ -glukanu oraz chityny jako sorbentów metali ciężkich w kontekście ich potencjalnego wykorzystania w bioremediacji. W ramach celu głównego Doktorantka postawiła sobie również cele szczegółowe dotyczące:

- charakterystyki grzybowych (1→3)- $\alpha$ -glukanów;
- określenia zdolności sorpcyjnych (1 → 3)- $\alpha$ -glukanów pozyskanych z różnych gatunków grzybów, a następnie wyselekcjonowanie najlepszego grzybowego  $\alpha$ -glukanu, z grzyba *Lentinus edodes* (shiitake) wraz z oceną jego właściwości fizykochemicznych;
- wyizolowanie chityny z owada *Hermetia illucens* wraz z wyborem odpowiedniej metody izolacji;
- oraz charakterystyki i oceny właściwości sorpcyjnych chityny wyizolowanej z *Hermetia illucens*.

W mojej opinii nie do końca zrozumiałą jest dobór różnych typów biopolimerów pozyskiwanych z tak odmiennych organizmów jak grzyby i owady, aczkolwiek wspólnym mianownikiem badań są ich właściwości sorpcyjne. Nie umniejsza to oczywiście jakości wykonanych prac oraz prawidłowości doboru tematyki rozprawy doktorskiej. Na uwagę zasługuje również fakt, iż są to materiały odpadowe pochodzące po hodowli wybranych do badań grzybów i owadów, co ma wymierny aspekt aplikacyjny.

Pierwsza z zaprezentowanych prac, zatytułowana *A report on fungal (1→3)-α-D-glucans: properties, functions and application* została opublikowana w 2019 roku w czasopiśmie *Molecules* i była pracą o charakterze przeglądowym. W pracy tej scharakteryzowano właściwości fizykochemiczne, strukturę i funkcje (1→3)-α-glukanów pochodzenia grzybowego. Szczególną uwagę zwrócono na przedstawienie roli biologicznej tych biopolimerów w infekcji roślin oraz w patogenezie aspergilozy płuc wywołanej przez grzyba *Aspergillus fumigatus*. Większą część pracy Autorzy poświęcili aplikacyjności (1→3)-α-glukanów, prezentując możliwości ich wykorzystywania między innymi do produkcji (1→3)-α-D-glukanaz oraz jako nośników stosowanych do immobilizacji enzymów. Przedstawiono także ich znaczenie w kontekście medycznym jako czynników wykazujących aktywność immunomodulacyjną oraz wykazano ich właściwości prebiotyczne. Odrębny rozdział pracy przeglądowej został poświęcony wyłącznie właściwościom sorpcyjnym (1→3)-α-glukanów. Pomimo, że praca ma charakter przeglądowy w dużym stopniu uzupełnia i systematyzuje dotychczasową wiedzę na temat grzybowych (1→3)-α-glukanów oraz wskazuje na duży poziom znajomości prezentowanych zagadnień przez Doktorantkę.

Druga z prac *Fungal (1→3)-α-D-glucans as a new kind of biosorbent for heavy metals* ukazała się w renomowanym czasopiśmie *International Journal of Biological Macromolecules*. Celem pracy jaki obrała sobie Doktorantka, było badanie przesiewowe polegające na wyizolowaniu (1→3)-α-glukanów z 16 różnych gatunków grzybów z jednoczesnym sprawdzeniem ich właściwości sorpcyjnych wobec metali ciężkich ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ). W wyniku przeprowadzonych analiz Doktorantka wykazała, że glukany wyekstrahowane z



grzybów: *Ganoderma lucidum*, *Boletus edulis* i *Lentinus edodes* (shiitake) wykazują najlepsze zdolności sorpcyjne względem badanych metali. Do dalszych etapów badań (mimo lepszych wyników sorpcyjnych glukanów uzyskanych dla dwóch pierwszych gatunków grzybów) wytypowano  $\alpha$ -glukan z grzyba *L. edodes*, argumentując taki wybór łatwością pozyskiwania materiału grzybowego na dużą skalę a co za tym idzie względami ekonomicznymi. W kolejnym etapie badań Doktorantka analizowała właściwości sorpcyjne (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-glukanów pozyskanych z różnych odmian *L. edodes*. Ostatecznie do dalszych analiz wybrała grzyba *L. edodes* odmiana SH 37. Drugą część swojej pracy Doktorantka poświęciła charakterystyce fizykochemicznej otrzymanego biopolimeru jakim był (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-glukan pozyskany z odmiany SH 37 *L. edodes*. W tym celu wykorzystwała szereg technik analitycznych takich jak: metody mikroskopowe SEM, techniki dyfrakcji rentgenowskiej, techniki spektroskopowe FT-IR i FT-Raman, analizę metylacyjną oraz NMR. Badania te pozwoliły na wysunięcie hipotezy dotyczącej próby wyjaśnienia zdolności sorpcyjnych glukanów, co według Doktorantki związane jest z dobrze rozwiniętą powierzchnią, niską krystalicznością oraz dużą liczbą grup hydroksylowych obecnych na powierzchni polimeru.

Trzecia praca opublikowana w czasopiśmie *Polymers* pt. „*Isolation of Chitin from Black Soldier Fly (Hermetia illucens) and its usage to metal sorption*” dotyczyła doboru najlepszej procedury izolacji chityny z *Hermetia illucens*, charakterystyki właściwości uzyskanego biopolimeru oraz zbadania jego właściwości sorpcyjnych wobec jonów niklu. W wyniku przeprowadzonych badań Doktorantce udało się zaproponować trój etapową procedurę izolacji chityny polegającą na: i) demineralizacji 1M HCl w 22°C przez 1 h; ii) deprotenizacji 1M NaOH w 80°C przez 24 h oraz iii) depigmentacji 9% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w 80°C przez 2,5 h. Wydajność tej procedury wyniosła w granicach 5,69-7,95%. Uzyskane warianty chityny Doktorantka scharakteryzowała różnymi technikami badawczymi (mikroskopia optyczna i konfokalna, FTIR, XRD, EDX, analiza termogravimetryczna). W wyniku przeprowadzonych analiz Doktorantka wykazała, iż wyekstrahowana chityna posiada formę alfa, ze stopniem krystaliczności 60% i maksymalną temperaturą rozkładu ~ 392°C. Ostatni etap badań dotyczył sprawdzenia



właściwości sorpcyjnych badanego biopolimeru. Poza wykazaniem takich zdolności wobec dwuwartościowych jonów niklu, Doktorantka pokusiła się o zaproponowanie tezy, iż ich sorpcja na chitynie z *H. illucens* zachodzi z dużym prawdopodobieństwem na skutek dwóch równoległych mechanizmów tj. wymiany jonowej i kompleksowania.

Podsumowując tą część rozprawy doktorskiej nie mam uwag krytycznych, co do sposobu zaplanowania i wykonania zaprezentowanych prac badawczych jednak w tym miejscu nasuwają się pytania/uwagi do dyskusji podczas obrony pracy doktorskiej:

- Jakimi kryteriami kierowała się Doktorantka w trakcie wyboru materiału badawczego, zarówno przy wyborze gatunków grzybowych jak i gatunku badanego owada?

- Czy przynależność gatunkowa grzybów została potwierdzona badaniami genetycznymi np. poprzez uzyskanie sekwencji nukleotydowej regionu ITS (internal transcribed spacer)?

- Dlaczego w publikacji dotyczącej badania właściwości sorpcyjnych chityny zbadano tylko właściwości sorpcyjne jonów  $Ni^{2+}$ , omijając pozostałe jony  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ , które badano w pracy poświęconej glukanom? Takie badania dałyby bez wątpienia pełniejszy obraz informacji na temat właściwości sorpcyjnych chityny i byłyby ciekawsze w kontekście porównania właściwości sorpcyjnych biopolimerów pochodzenia grzybowego i owadziego.

- W autoreferacie brakuje podsumowania wyników w formie porównania właściwości fizykochemicznych i sorpcyjnych wybranych do badań biopolimerów oraz dalszego kierunku badań nad podjętym tematem.

### **3. Formalna ocena pracy**

Rozprawa doktorska została przygotowana w sposób staranny, aczkolwiek w trakcie pisania autoreferatu Doktorantka nie uniknęła kilku błędów językowych oraz interpunkcyjnych np.:

- str. 7 „jest to z pewnością procesem długotrwałym” powinno być „jest to z pewnością proces.....”

- str.16 „Dodatkowo, chitynę i chitozan stosowane są jako składnik” powinno być ..”stosuje się jako składnik ...albo „stosowane są jako składniki ...”



- w spisie treści widnieje w pozycji 6. Bibliografia na końcu autoreferatu 6. Literatura str.35 (notabene termin zarezerwowany bardziej dla nauk humanistycznych niż biologicznych).

Bardzo widoczny jest również brak odnośnika w prezentowanej liście publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej przy nazwisku Nowak K., który wyjaśniałby, że osoby widniejące pod nazwiskami Złotko i Nowak to te same osoby.

#### 4. Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowując, rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Złotko zawiera oryginalne, wartościowe wyniki dotyczące możliwości wykorzystania nowych biopolimerów o właściwościach sorpcyjnych względem metali ciężkich do zastosowań bioremediacyjnych. Uzyskane wyniki badań mogą mieć również bardzo ważne znaczenie aplikacyjne ze względu na możliwość zagospodarowania odpadowej biomasy z której uzyskano biopolimery.

W trakcie wykonywania pracy badawczej oraz podczas przygotowywania rozprawy doktorskiej pani mgr Złotko wykazała się dużą umiejętnością planowania i realizacji zadań badawczych oraz ich realizacji z wykorzystaniem zaawansowanych technik badawczych.

Ostatecznie stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja Pani mgr Katarzyny Złotko pt. "Sorpcja metali ciężkich na alfa-glukanach i chitynie" spełnia warunki stawiane pracom doktorskim w związku z ubieganiem się o stopień doktora nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo określone w art.13 ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz.U. z 2017 r., poz. 1789), zgodnie z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. „Przepisy wprowadzające ustawę- Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669)”. Dlatego też, zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN w Lublinie o dopuszczenie Pani mg Katarzyny Złotko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, 20.07.2021

dr hab. Monika Osińska-Jaroszuk

M. Osińska-Jaroszuk



