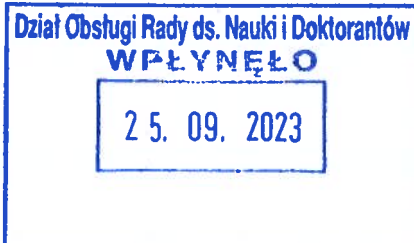




UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny



dr hab. Katarzyna Sułkowska-Ziaja  
Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej  
Wydział Farmaceutyczny  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum  
W Krakowie

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**mgr inż. Bartosza Kózki**

### OCENA MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA GRZYBÓW Z GATUNKU *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM* I *PLEUROTUS* *OSTREATUS* DO USUWANIA Z WODY WYBRANYCH SUBSTANCJI CZYNNYCH LEKÓW

wykonanej w Zakładzie Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

*Podstawą formalną przygotowania recenzji jest pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego prof. dr hab. Grzegorza Nałęcza-Jaweckiego z dn. 5 lipca 2023 z prośbą o objęcie obowiązków recenzenta rozprawy doktorskiej mgr inż. Bartosza Kózki na temat: „Ocena możliwości zastosowania grzybów z gatunku *Phanerochaete chrysosporium* i *Pleurotus ostreatus* do usuwania z wody wybranych substancji czynnych leków”. Rozprawa doktorska zastała przygotowana pod kierunkiem Pani Promotor dr hab. n. farm. Joanny Giebułtowicz.*

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej  
ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, tel. +48 12 620 54 30  
[www.farmacja.cm.uj.edu.pl](http://www.farmacja.cm.uj.edu.pl)

## 1. Celowość podjętej tematyki

Nieskuteczność fizykochemicznych metod usuwania zanieczyszczeń farmaceutycznych ze środowiska sprawiła, że naukowcy poszukują nowych rozwiązań, w tym metod opartych na wykorzystaniu organizmów żywych. Jednym z interesujących rozwiązań jest mykoremediacja. Grzyby posiadają zdolność do degradacji zanieczyszczeń dzięki obecności enzymów z grupy peroksydaz zdolnych do rozkładu ksenobiotyków. Enzymy lignolityczne oraz związki bogate w reszty sulfhydrylowe obecne w ścianie komórkowej grzybów posiadają zdolność przekształcania zanieczyszczeń na związki mniej szkodliwe dla środowiska. Skuteczność grzybów wynika przede wszystkim z ich zdolności do szybkiego namnażania się strzępek, a co za tym idzie możliwości produkcji dużej ilości biomasy oraz powszechnego występowania w środowisku.

Organizmy te stanowią zatem obiecującą alternatywę dla tradycyjnych metod usuwania zanieczyszczeń farmaceutycznych, a ich zdolności biodegradacyjne oparte na aktywności enzymatycznej i specyficznych mechanizmach przekształcania substancji obcych mogą przyczynić się do ich znaczącej roli w ochronie środowiska.

Nadrzędnym celem przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Bartosza Kózki było określenie zdolności dwóch gatunków z gromady podstawczaków (Basidiomycota): gatunku z rodzaju korownica *Phanerochaete chrysosporium* i gatunku z rodzaju bocznik *Pleurotus ostreatus* do usuwania wybranych substancji czynnych leków (API) ze środowiska wodnego. Ponadto Autor przeprowadził proces optymalizacji alternatywnego niskokosztowego podłoża hodowlanego służącego do namnażania biomasy z przeznaczeniem do usuwania ze środowiska wodnego wybranych substancji czynnych leków.

Cel został zrealizowany poprzez:

- Przeprowadzenie analizy zdolności gatunków *Phanerochaete chrysosporium* i *Pleurotus ostreatus* do eliminacji 17 wybranych substancji farmaceutycznych reprezentujących zróżnicowane grupy terapeutyczne, takie jak związki immunosupresyjne (kwas mykofenolowy), leki przeciwdepresyjne (citalopram, klomipramina, fluoksetyna, mianseryna, moklobemid, paroksetyna, sertralina, wenlafaksyna), leki stosowane w chorobach układu sercowo-naczyniowego (atorwastatyna, losartan, propranolol, telmisartan, walsartan) oraz związki przeciwdrobnoustrojowe, w tym antybiotyki makrolidowe (azytromycyna,

erytromycyna, sulfametoksazol) z płynnego podłoża hodowlanego w okresie od 1 godziny do 4 dni. Wszystkie te substancje farmaceutyczne zostały wykryte w środowisku w stężeniach, które mogą stanowić zagrożenie dla flory i fauny.

- Zidentyfikowanie i zbadanie struktur produktów rozkładu badanych substancji farmaceutycznych, jak również zaproponowanie możliwych dróg ich degradacji. Ten etap miał na celu lepsze zrozumienie procesu rozkładu substancji farmaceutycznych przez grzyby.
- Przeprowadzenie oceny toksyczności pożywek hodowlanych, aby określić, czy produkty rozkładu nie wykazują wyższej toksyczności dla środowiska w porównaniu z substancjami macierzystymi.
- Określenie aktywności dwóch kluczowych enzymów ligninolitycznych obecnych w podłożu hodowlanym. Dzięki temu zweryfikowano, czy te enzymy wykazują ekspresję w danym gatunku grzyba w określonych warunkach hodowlanych.
- Przeprowadzenie oceny użyteczności 18 składników podłoża, w tym siedmiu produktów ubocznych przemysłu rolno-spożywczego, jako potencjalnych składników podłoża hodowlanego dla gatunków *Phanerochaete chrysosporium* i *Pleurotus ostreatus*.
- Wybór optymalnego modelu matematycznego opisującego zależność między szybkością wzrostu biomasy, a ilością wybranego produktu ubocznego przetwórstwa kukurydzy w podłożu, takiego jak namocz kukurydziany (CSL) lub wywar gorzelniany suszony (DDGS). Informacja ta była kluczowa dla projektowania procesu oczyszczania ścieków z wykorzystaniem WRF w skali przemysłowej. Modelowanie matematyczne ograniczono do składników CSL i DDGS, ponieważ to w ich obecności zaobserwowano najintensywniejszy przyrost biomasy grzybowej.
- Ocenę zdolności gatunku *Pleurotus ostreatus* do usuwania ośmiu różnych substancji farmaceutycznych w obecności medium zawierającego CSL jako jedyne źródło węgla i azotu. Hodowla grzybów na pożywkach CSL i DDGS umożliwiła uzyskanie podobnego wzrostu WRF, z tym że CSL wykazywało skuteczność przy niższym stężeniu niż DDGS.

Rozprawa doktorska Pana mgr inż. Bartosza Kózki znakomicie wpisuje się w nurt badań, jakim jest opracowanie skutecznych strategii przeciwdziałania zanieczyszczeniu środowiska.

Tematykę pracy uważam za niezmiernie ważną zarówno z naukowego, jak i praktycznego punktu widzenia.

## 2. Charakterystyka rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska powstała w oparciu o cykl czterech spójnych tematycznie artykułów naukowych, w tym trzech anglojęzycznych prac eksperymentalnych oraz jednej polskojęzycznej pracy o charakterze przeglądowym. Prace zostały wydane w latach 2020-2023.

Prace badawcze zostały opublikowane w czasopismach posiadających wysoki współczynnik wpływu (IF) i wysoko punktowanych przez Ministerstwo Nauki i Edukacji. Sumaryczny Impact factor w tym przypadku osiągnął wartość 18,692 z kolei suma punktów MNiE wyniosła 360 i jest to w mojej ocenie doskonały wynik zważywszy na krótki czas powstania prac.

W trzech pracach, w tym dwóch o charakterze badawczym Doktorant jest pierwszym autorem, a w pracy o charakterze przeglądowym jest dodatkowo autorem korespondencyjnym.

Zgodnie załączonymi oświadczeniami współautorów prac Jego udział w powstaniu wyżej wymienionych artykułów jest znaczący. W pracach o charakterze badawczym Doktorant był odpowiedzialny za opracowanie metodologii badań, wykonanie badań, interpretację wyników, sformułowanie wniosków oraz był zaangażowany w przygotowanie manuskryptu.

Dodatkowo Autor załączył wykaz doniesień zjazdowych dotyczących pracy doktorskiej, według którego prezentował wyniki swoich badań na renomowanych konferencjach międzynarodowych.

Poza opublikowanymi pracami przedłożona do recenzji rozprawa doktorska obejmuje wykaz skrótów, jednostronicowe streszczenie w języku polskim i angielskim, czterostronicowy wstęp wraz z piśmiennictwem obejmującym 29 pozycji, dwustronicowy cel pracy oraz jednostronicowe podsumowanie i wnioski.

**Pierwsza** z zaprezentowanych prac zatytułowana: *Pozostałości substancji farmakologicznie czynnych jako zanieczyszczenie środowiska i rola grzybów białej zgnilizny w ich usuwaniu* jest obszernym, polskojęzycznym opracowaniem teoretycznym.

Autorzy szczegółowo opisują przyczyny obecności substancji aktywnych leków w środowisku wodnym, ich negatywny wpływ na organizmy żywe, regulacje prawne dotyczących obecności związków farmakologicznych w środowisku, ale przede wszystkim zdolności grzybów do rozkładu substancji o znaczeniu terapeutycznym. Autorzy zwracają uwagę na różnorodność substancji farmakologicznych, które zanieczyszczają środowisko, wymieniając niesteroidowe leki przeciwzapalne, antybiotyki, substancje biobójcze, sterydy i leki stosowane w leczeniu schorzeń ośrodkowego układu nerwowego i układu krwionośnego. W pracy podkreślono, że problem pozostałości substancji farmakologicznie czynnych jako zanieczyszczenie środowiska związany jest z brakiem dostosowania konwencjonalnych oczyszczalni ścieków do usuwania tych substancji, co skutkuje ich przedostawaniem się do środowiska naturalnego i stanowi zagrożenie dla organizmów, w tym ludzi, oraz zaburza ekosystemy. W poszukiwaniu nowych metod usuwania substancji aktywnych leków z wody zwrócono uwagę na gatunki określane jako grzyby białej zgnilizny WRF (ang. White-Rot Fungi), które posiadają zdolność do rozkładu różnych związków, co zostało potwierdzone w licznych badaniach.

W publikacji tej Doktorant był pierwszym i zarazem korespondencyjnym autorem, był odpowiedzialny za koncepcję pracy, napisanie oryginalnego szkicu oraz jej redakcję, co świadczy o dużej wiedzy teoretycznej oraz dojrzałości naukowej Doktoranta.

**Druga** praca opublikowana w czasopiśmie Journal of Environmental Management *Application of Pleurotus ostreatus to efficient removal of selected antidepressants and immunosuppressant* dotyczyła możliwości skutecznego usuwania wybranych leków przeciwdepresyjnych i immunosupresyjnych z podłoża hodowlanego przez gatunek *Pleurotus ostreatus*.

W tym celu zbadano skuteczność usuwania środków farmaceutycznych poprzez analizę produktów rozpadu, aktywność enzymów ligninolitycznych grzybów oraz toksyczność podłoża przed- i pohodowlanego wobec gatunku *Spirostomum ambiguum*.

Wykazano, że *Pleurotus ostreatus* może skutecznie usuwać większość substancji czynnych leków, w tym klomipraminę, mianserynę, paroksetynę, sertralinę i kwas mykofenolowy. Udowodniono, że aktywność enzymów ligninolitycznych grzybów była znacznie wyższa w obecności środków farmaceutycznych, co sugeruje ich udział w procesie degradacji. Ponadto zidentyfikowano ponad dwadzieścia metabolitów powstałych w wyniku utlenienia lub demetylacji farmaceutycznych produktów macierzystych. Opracowana przez Doktoranta metoda oczyszczania biologicznego oparta na *Pleurotus ostreatus* wydaje się być

wygodna i skuteczna w mykoremediacji ścieków środowiskowych zanieczyszczonych farmaceutykami, szczególnie lekami przeciwdepresyjnymi i immunosupresyjnymi, które wykazują podatność na tę formę oczyszczania.

Przedstawione przez Doktoranta wyniki stanowią wartościowe nowatorskie uzupełnienie dotychczasowej wiedzy na temat gatunków WRF. Zastosowane w pracy metody świadczą o umiejętnościach posługiwania się szerokim spektrum technik badawczych obejmujących zarówno metody uzyskiwania biomasy grzybowej w warunkach laboratoryjnych, poprzez analizy LCMS czy stosowanie testów toksyczności czy badających aktywność enzymatyczną.

W **trzeciej** pracy zatytułowanej *Various species of Basidiomycota fungi reveal different abilities to degrade pharmaceuticals and also different pathways of degradation* opublikowanej w czasopiśmie Chemosphere Autorzy testowali wybrane gatunki należące do grupy grzybów białej zgnilizny jako alternatywę dla mikroorganizmów w procesie oczyszczania ścieków. W badaniu wykorzystano gatunki *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* i *Armillaria mellea* w celu usuwania leków przeciwdepresyjnych, immunosupresyjnych, antybiotyków i leków stosowanych w chorobach układu krążenia z wód środowiskowych. W badaniach udowodniono, że skuteczność usuwania tych farmaceutyków jest zależna gatunkowo, co wskazuje na konieczność intensywnego badania tej grupy organizmów.

Wykazano, że najczęstsze transformacje chemiczne to utlenianie i dealkylacja. Interesujący jest fakt, że *Phanerochaete chrysosporium* i *Armillaria mellea* przekształcają substancje czynne w produkty uznawane za nietoksyczne dla bakterii i pierwotniaków. Jednakże w przypadku *Pleurotus ostreatus* konieczne jest zbadanie toksyczności dla bakterii, co sugeruje potrzebę dalszych badań nad metabolizmem tego gatunku grzyba.

Podsumowując, Autorzy podkreślają potrzebę dalszych badań, w tym badania na rzeczywistych próbkach ścieków zanieczyszczonych farmaceutykami, aby lepiej zrozumieć i ocenić zdolność różnych gatunków grzybów białej zgnilizny do usuwania farmaceutyków z środowiska wodnego.

W **czwartym** artykule *Optimization of white-rot fungi mycelial culture components for bioremediation of pharmaceutical-derived pollutants* opublikowanym w czasopiśmie Water badano zdolność wybranych gatunków grzybów białej zgnilizny do degradacji szerokiej gamy substancji zanieczyszczających środowisko, w tym środków

farmaceutycznych, które nie są skutecznie eliminowane konwencjonalnymi metodami oczyszczania ścieków, takimi jak metoda osadu czynnego. W pracy Autorzy zwracają uwagę na ograniczenia w stosowaniu kultur grzybów do oczyszczania ścieków, w tym wymóg stosowania odpowiednich i często kosztownych pożywek. Ponadto celem badań była ocena i wybór niedrogiego podłoża hodowlanego optymalnego pod kątem produkcji biomasy i aktywności lakazy poprzez badanie przesiewowe 18 składników podłoża, w tym produktów ubocznych rolnictwa, pod kątem trzech grzybów białej zgnilizny: *Armillaria mellea*, *Phanerochaete chrysosporium* i *Pleurotus ostreatus* w kulturach zanurzonych. W celu opisanie związku pomiędzy wzrostem grzybów a wybranymi produktami ubocznymi w mediach testowano różne modele matematyczne.

Warto zauważyć, że *Pleurotus ostreatus*, który wykazywał najwyższą aktywność enzymu ligninolitycznego, wykazał obiecujące wyniki drgradacji sześciu z ośmiu substancji w ciągu 48 godzin, osiągając współczynnik usuwania w zakresie od 20% do 90%. W badaniu przytoczono także równanie Hana – Levenspiela jako skuteczny model opisu specyficznej szybkości wzrostu w odniesieniu do nominalnego stężenia substratu w pożywkach jednoskładnikowych.

### 3. Podsumowanie

Pan mgr inż. Bartosz Kózka w rozprawie doktorskiej dowiódł, że badane gatunki grzybów białej zgnilizny drewna posiadają zdolność do usuwania substancji farmaceutycznych o charakterze przeciwdepresyjnym, immunosupresyjnym, przeciwdrobnoustrojowym oraz stosowanych w leczeniu chorób układu krążenia ze środowiska wodnego. Autor potwierdził, że ich skuteczność zależy od gatunku grzyba i substancji farmaceutycznej, a transformacje chemiczne, głównie utlenianie i dealkilacja, odgrywają kluczową rolę w procesie rozkładu substancji farmaceutycznych.

Wartościowym wnioskiem z badań jest fakt, że *Phanerochaete chrysosporium* przekształca substancje czynne w nietoksyczne produkty dla bakterii i pierwotniaków, co może prowadzić do produkcji bezpiecznych produktów ubocznych.

Kolejnym ważnym wnioskiem z przeprowadzonych badań jest dowiedzenie, że produkty uboczne przemysłu rolno-spożywczego, takie jak CSL (skondensowana wytłoczyna z kukurydzy) i DDGS (sucha śruta z kukurydzy), mogą być z powodzeniem wykorzystywane jako podłoże hodowlane dla badanych gatunków *Phanerochaete chrysosporium* i *Pleurotus ostreatus*. W skali przemysłowej może to znacząco obniżyć koszty pozyskania biomasy z

przeznaczeniem do mykoremediacji. Dodatkową korzyścią z proponowanych podłoży hodowlanych jest obecność nierozpuszczalnych cząstek CSL lub DDGS w medium, które mogą służyć jako miejsce, na którym grzybnia może się osadzać w bioreaktorze. To może zapobiec zakłóceniom w funkcjonowaniu bioreaktora związanym z osadzaniem się grzybnia na elementach konstrukcyjnych, co jest istotne w procesie hodowli grzybów.

**Reasumując merytoryczną część recenzji** pragnę podkreślić, że zaprezentowane do oceny prace stanowią monotematyczny, oryginalny cykl publikacji, które w sposób kompleksowy przyczyniają się do poszerzenia naszej wiedzy na temat potencjału mykoremediacyjnego dwóch gatunków z grupy grzybów białej zgnilizny.

Tym samym Doktorant zrealizował wszystkie postawione sobie cele naukowe uzyskując wyniki o dużej wartości poznawczej oraz potencjale aplikacyjnym. W pracach badawczych mamy do czynienia z nowatorskim podejściem do zaprezentowanych zagadnień i wysoką jakością prowadzonych badań pod względem metodycznym.

Nie mam żadnych uwag krytycznych co do sposobu zaplanowania i wykonania przedłożonych do recenzji prac, które zostały przygotowane w sposób rzetelny, prezentują wysoki poziom merytoryczny, świadczą o dużych umiejętnościach badawczych i dojrzałości naukowej Doktoranta.

W tym miejscu nasuwają się następujące pytania/uwagi do dyskusji podczas obrony pracy doktorskiej:

- *czy wyniki uzyskane z wykorzystaniem modelowego medium w pełni odzwierciedlają skomplikowane warunki panujące w zanieczyszczonym środowisku wodnym?*
- *jakie są realne wyzwania związane z przenoszeniem tego procesu na większą skalę?*
- *jakie są dalsze plany badawcze Doktoranta?*
- *na stronie Polskiego Towarzystwa Mykologicznego widnieje informacja o rekomendowanych nazwach polskich gatunków grzybów, według tych informacji gatunkowi *Phanerochaete chrysosporium* została nadana nazwa polska której nie przytoczono w opracowaniu poprzedzającym cykl publikacji. Czy Doktorantowi znane są te informacje?*



#### **4. Formalna ocena pracy**

Każda uczelnia wyższa formułuje indywidualne wymogi dotyczące elementów składowych rozprawy doktorskiej, której trzon, jak w tym przypadku stanowi monotematyczny cykl publikacji. Według mojej wiedzy praca została przygotowana ściśle według obowiązujących wskazań. Jednakże w tak skonstruowanym opracowaniu bardzo cennym wydawałby się krótki opis zastosowanych metod zważywszy, że oceniane prace mają charakter interdyscyplinarny.

Podobne wrażenie dotyczy braku podsumowania w tak zaprezentowanej rozprawie doktorskiej. Pomimo, że dyskusja zawarta jest w każdym z artykułów badawczych, w dołączonym kilkunastostronicowym opracowaniu zwraca uwagę jej brak jako elementu spajającego w całość opublikowane w oddzielnych pracach wyniki.

## 5. Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowując, uważam przedstawione do recenzji publikacje za znaczący i oryginalny wkład do poznania zdolności dwóch wytypowanych do badań gatunków z rodzajów *Phanerochaete* i *Pleurotus* do usuwania wybranych substancji czynnych ze środowiska wodnego.

Za bardzo ważny aspekt pracy uważam zaproponowanie niskokosztowego medium do prowadzenia kultur mycelialnych zanurzeniowych badanych gatunków.

Uzyskane wyniki badań posiadają charakter użyteczny i potencjalnie mogą zostać wykorzystane w bioremediacji inżynierskiej.

W mojej opinii przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr inż. Bartosza Kózki zatytułowana: „Ocena możliwości zastosowania grzybów z gatunku *Phanerochaete chrysosporium* i *Pleurotus ostreatus* do usuwania z wody wybranych substancji czynnych leków” spełnia warunki stawiane pracom doktorskim w związku z ubieganiem się stopień doktora nauk farmaceutycznych określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz. 1668 z późn. zm.). Dlatego też zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr inż. Bartosza Kózki do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

**Jednocześnie zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej z uwagi na jej wysoki poziom naukowy, walory poznawcze i aplikacyjne, a także na znaczenie uzyskanych wyników.**

Kraków 20.09.2023

Katarzyna Sułkowska-Ziaja

*Katarzyna Sułkowska - Ziaja*