UNIWERSYTET
PEDAGOGICZNY
IM. KOMISJI EDUKACJI
NARODOWEJ W KRAKOWIE

Dr hab. Magdalena Nowak-Chmura, prof. UP
Katedra Zoologii, Instytut Biologii i Nauk o Ziemi
Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych
Uniwersytet Pedagogiczny w Krakowie
magdalena.nowak-chmura@up.krakow.pl

Kraków, 18.06. 2023

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani mgr Eweliny Farian
pt. „Mikologiczne zanieczyszczenie filtrów w samochodowych instalacjach klimatyzacyjnych ze szczególnym uwzględnieniem grzybów należących do rodzaju *Aspergillus*"

Niniejszą rozprawę przygotowano na podstawie Uchwały Rady Naukowej Instytutu Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki w Lublinie z dnia 5 kwietnia 2023 roku.

Rozprawa doktorska Pani mgr Eweliny Farian pt. „Mikologiczne zanieczyszczenie filtrów w samochodowych instalacjach klimatyzacyjnych ze szczególnym uwzględnieniem grzybów należących do rodzaju *Aspergillus*" powstała w Zakładzie Biologicznych Szkodliwości Zdrowotnych i Parazytologii Instytutu Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki w Lublinie pod kierunkiem Pani Promotor dr hab. n. o zdr. Angeliny Wójcik-Fatli, Prof. IMW, a zatem w znanym i cenionym ośrodku naukowym pod opieką merytoryczną Promotorki dysponującej doświadczeniem i wybitnym dorobkiem naukowym.

Ponieważ liczba biologicznych czynników zagrożenia zawodowego wciąż wzrasta, a grzyby, szczególnie z rodzaju *Aspergillus* wywierają niekorzystny wpływ na zdrowie ludzi i mogą być przyczyną wielu chorób, w pełni popieram wybór tematu badań naukowych, które zaowocowały rozprawą doktorską i mogą przyczynić się do opracowania wytycznych dotyczących prawidłowego użytkowania klimatyzacji samochodowych i ochrony przed czynnikami biologicznymi.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Eweliny Farian ma formę klasycznej rozprawy doktorskiej w postaci oprawionego manuskryptu liczącego 147 stron, zawierającego 21 tabel i 15 rycin, które są integralną częścią rozprawy i starannie ilustrują przedstawione dane. Doktorantka sporządziła również spis skrótów. Wyróżnia się starannym opracowaniem graficznym, oraz przejrzystym i logicznym układem spełniającym we wszystkich szczegółach wymagania stawiane pracom doktorskim. Jest podzielona na standardowe dla prac biologicznych rozdziały. Ich układ i kolejność nie budzi zastrzeżeń. Bibliografia (300 pozycji) obejmuje najważniejsze polskie i obcojęzyczne pozycje literatury, w tym źródła internetowe, Rozporządzenia i Dyrektywy Komisji i Parlamentu Europejskiego i Rozporządzenia Ministra Zdrowia. Zdecydowana większość to najnowsze pozycje literatury z ostatniego dziesięciolecia.

Pierwszy rozdział rozprawy doktorskiej **Wstęp** liczy 27 stron. W tym obszernym przeglądzie literatury, Doktorantka charakteryzuje pokrótce wiele aspektów, które obrazują potrzebę podjęcia niniejszych badań. Zwraca uwagę na rozwój technologiczny systemu klimatyzacji pojazdów, porusza kwestie dotyczące jakości powietrza w samochodach osobowych i ciężarowych oraz jego wpływu na zdrowie kierowców i pasażerów, charakteryzuje czynniki biologiczne występujące w powietrzu wywierające niekorzystny wpływ na zdrowie ludzi, zwraca uwagę na polski i światowy problem wyznaczenia i uznania norm dotyczących wartości dopuszczalnych stężeń szkodliwych czynników biologicznych na różnych stanowiskach pracy. Dużo miejsca w rozdziale „Wstęp" Doktorantka poświęciła na charakterystykę grzybów z rodzaju *Aspergillus* w kontekście czynników chorobotwórczych, szczegółowo wyjaśniła szkodliwe metabolity wytwarzane przez grzyby i w bardzo ciekawy i przejrzysty sposób, cytując wielu specjalistów, zaprezentowała choroby wywoływane przez grzyby z rodzaju *Aspergillus*. Doktorantka przedstawiła również ogólne informacje na temat klimatyzacji samochodowej, jej budowy, która ma wpływ nie tylko na chłodzenie i komfort jazdy ale przede wszystkim powinna zapewniać ochronę przed szkodliwymi dla zdrowia ludzi i zwierząt zanieczyszczeniami, szczególnie mikologicznymi gromadzącymi się w filtrach klimatyzacji samochodowej.

Treść rozdziału „Wstęp" rozprawy doktorskiej jest wartościowym uzupełnieniem rozprawy, odpowiada tematowi określonemu w tytule rozprawy i wskazuje myśl przewodnią podjęcia tematyki badań, którą szczegółowo, w punktach Doktorantka zawarła w kolejnym rozdziale **Cel pracy**.

W następnym rozdziale **Materiał i metody** (18 stron) Autorka zamieściła metody,

procedury i schematy przeprowadzonych badań i analiz oraz zastosowanych testów. Dokładnie opisała przygotowanie materiału badawczego do analiz, opisała metody molekularne wykorzystane w badaniach oraz metody analizy statystycznej. O ogromie pracy włożonej w techniczną realizację badań świadczy rzetelny opis technik i metod związanych z pozyskiwaniem materiału oraz opracowywaniem go w zakresie biologicznym, molekularnym i statystycznym. Wszystkie wymienione metody w tym narzędzia statystyczne zastosowano poprawnie, jak również prawidłowo wykorzystano przy interpretacji wyników.

Doktorantka przeprowadziła między innymi:

- analizę zanieczyszczenia mikologicznego filtrów kabinowych z wykorzystaniem metod hodowli;
- analizę bioróżnorodności gatunkowej grzybów z rodzaju *Aspergillus* z wykorzystaniem metod biologii molekularnej;
- oznaczanie mikotoksyn metodą immunoenzymatyczną ELISA;
- identyfikację potencjalnie toksynotwórczych gatunków grzybów z rodzaju *Aspergillus*;
- ocenę aktywności enzymatycznej grzybów z rodzaju *Aspergillus*.

Czwarty rozdział recenzowanej rozprawy to **Wyniki** (31 stron) - stanowiące zasadniczą część pracy doktorskiej, zostały podzielone na cztery podrozdziały. Uzupełnieniem wyników są tabele i ryciny zamieszczone konsekwentnie w tekście pracy.

W pierwszym podrozdziale Doktorantka przedstawiła wyniki analizy ilościowej mikologicznego zanieczyszczenia filtrów kabinowych, wykazując między innymi:

- różnice w zanieczyszczeniu grzybami pleśniowymi filtrów kabinowych badanych w poszczególnych porach roku (najwyższe stężenie uzyskano latem);
- wyższe średnie stężenie grzybów uzyskanych w filtrach standardowych w porównaniu do filtrów węglowych;
- średnie stężenie grzybów pleśniowych wyższe w filtrach pobranych z samochodów, w których stosowano benzynę;
- najwyższe średnie stężenie grzybów pleśniowych uzyskanych w filtrach pobranych z samochodów osobowych wyprodukowanych w latach 2001-2010, najniższe w filtrach pobranych z pojazdów wyprodukowanych w latach 2011-2020;
- najwyższy poziom zanieczyszczenia mikologicznego filtrów uzyskano dla filtrów użytkowanych przez samochody o przebiegu od 150 tyś. km do 200 tyś. km, najniższy dla przebiegu poniżej 50 tyś. km;

- grzyby z rodzaju *Aspergillus* na poziomie 69,1% wśród wszystkich badanych filtrów standardowych oraz na poziomie 81,3% wśród badanych filtrów węglowych, grzyby *Aspergillus* dominowały głównie w filtrach użytkowanych od 1,5 roku do 2 lat.

W drugim podrozdziale Doktorantka przedstawiła wyniki analizy jakościowej grzybów pleśniowych obecnych w filtrach kabinowych, wykazując między innymi:

- obecność 29 rodzajów grzybów pleśniowych, wśród nich w filtrach kabinowych dominował rodzaj *Cladosporium* (95/100 filtrów), występowały też *Alternaria* (86/100 filtrów), *Aureobasidium* (54/100 filtrów), *Penicillum* i *Aspergillus* (73/100 filtrach), ponadto wykryto obecność grzybów niezarodnikujących (96/100 filtrów);
- największe zróżnicowanie składu rodzajowego grzybów pleśniowych w filtrach badanych wiosną – 20 rodzajów, następnie zimą – 19 rodzajów, latem i jesienią – 17 rodzajów, dominowały grzyby z rodzaju *Cladosporium*;
- identyfikację składu gatunkowego grzybów należących do rodzaju *Aspergillus* (dzięki analizie cech morfologicznych kolonii oraz obrazu mikroskopowego) co umożliwiło potwierdzenie obecności w filtrach izolatów *Aspergillus* i zakwalifikowanie ich do 9 sekcji, w tym sekcji: *Aspergillus, Candidi, Circumdati, Clavati, Flavi, Fumigati, Nidulantes, Nigri* oraz *Versicolores;*
- molekularne potwierdzenie 15 gatunków *Aspergillus* obecnych w filtrach kabinowych, gdzie dominował gatunek *Aspergillus fumigatus* (47/100 filtrów), kolejne to *A. clavatus* (11/100 filtrów), *A. niger* (8/100 filtrów), *A. pseudoglaucus* (8/100 filtrów), *A. nidulans* (7/100 filtrów), i *A. versicolor* (7/100 filtrów);
- obecność 16 gatunków *Aspergillus* w filtrach standardowych, 8 gatunków *Aspergillus* w filtrach węglowych, dominował gatunek *Aspergillus fumigatus,* Doktorantka wykazała go w 55,3% w filtrach standardowych i 80,8% w filtrach węglowych.

W trzecim podrozdziale Doktorantka przedstawiła wyniki analizy zawartości mikotoksyn obecnych w filtrach kabinowych oraz ocenę potencjału toksynotwórczego grzybów z rodzaju *Aspergillus*, wykazując między innymi:

- obecność sumy aflatoksyn (B_1, B_2, G_1,G_2), aflatoksyny B_1 oraz ochratoksyny A w badanych filtrach kabinowych, obecność sumy aflatoksyny stwierdzono w 63 na 100 zbadanych filtrów kabinowych (były to 53 filtry standardowe i 10 filtrów węglowych), natomiast obecność aflatoksyny B_1 stwierdzono w 67 na 100 zbadanych filtrów kabinowych (było to 56 filtrów standardowych i 11 węglowych) oraz obecność ochratoksyny A wykazano w 57 na 100

zbadanych filtrów (były to 44 filtry standardowe i 13 węglowych);
- najniższe średnie stężenie sumy aflatoksyn, aflatoksyny B_1 oraz ochratoksyny A w filtrach standardowych użytkowanych do roku czasu, natomiast najwyższe w filtrach użytkowanych powyżej 2 lat, natomiast w filtrach węglowych niższe średnie stężenie mikotoksyn było zauważalne w filtrach użytkowanych powyżej roku w porównaniu do filtrów użytkowanych do roku czasu;
- wyższe średnie stężenie aflatoksyn w filtrach, których samochody przejechały mniej niż 15 tyś. km;
- średnie stężenie ochratoksyny A na porównywalnym poziomie, zarówno w przypadku samochodów, które przejechały mniej niż 15 tyś. km i tych, które przejechały nawet do 30 tyś. km.

W czwartym podrozdziale Doktorantka przedstawiła wyniki oceny aktywności zewnątrzkomórkowych enzymów wytwarzanych przez grzyby z rodzaju *Aspergillus*, wykazując między innymi:
- najwyższą aktywność enzymatyczną spośród wszystkich badanych szczepów dla fosfatazy kwaśnej, β-glukozydazy, fosfohydrolazy naftolu i N-acetylo-β-glukozyloamidazy;
- wysokie poziomy aktywności dla fosfatazy zasadowej, która uzyskała niższy poziom aktywności dla przedstawicieli sekcji *Nigri*, w tym *Aspergillus japonicus* i *Aspergillus niger*;
- całkowity brak aktywności u wszystkich badanych szczepów dla 6 enzymów: lipazy (C14), arylamidazy cystyny, trypsyny, chymotrypsyny, β-glukuronidazy i α-fukozydazy;
- najwyższe wyniki aktywności, biorąc pod uwagę całkowitą aktywność wszystkich badanych enzymów – dla *Aspergillus ostianus, Aspergillus fumigatus* i *Aspergillus pseudoglaucus* oraz najniższe wyniki aktywności dla *Aspergillus clavatus, Aspergillus japonicus* i *Aspergillus niger*.

Rozdział **Dyskusja** liczy 19 i pół strony. Jest to bardzo wartościowa część pracy wnosząca dużo nowego do wiedzy na temat badań filtrów kabinowych jako źródła szkodliwych dla zdrowia mikroorganizmów. Doktorantka omówiła najważniejsze wyniki swoich badań na tle bogatego piśmiennictwa, wsparła się ponad 140 pozycjami najnowszej literatury przedmiotu. Doktorantka naświetliła omawiany problem w sposób wszechstronny i odpowiadający najnowszemu stanowi wiedzy, a przy tym interesujący i nie nużący czytelnika. Wykazała się godną uznania dogłębną znajomością problemu realizowanego w rozprawie.

W rozdziale **Wnioski** Doktorantka prezentuje 13 rzeczowych wniosków, stanowiących

podsumowanie i wynikających bezpośrednio z przeprowadzonych badań.

Rozprawę doktorską kończy: **Literatura** (29 i pół strony, 300 pozycji literatury), **Spis tabel** (1,5 strony), **Spis rycin** (1,5 strony), **Streszczenie** w języku polskim i angielskim (w sumie 4 i pół strony).

Rozprawa doktorska przygotowana przez Panią mgr Ewelinę Farian stanowi cenny wkład w polskie i światowe badania mikologiczne zanieczyszczeń filtrów kabinowych z klimatyzacji samochodów osobowych.

Na podkreślenie zasługuje szczególnie:

- bardzo dobrze zaplanowany metodycznie warsztat badawczy, znajomość technik i metod zarówno laboratoryjnych i molekularnych, dzięki którym Doktorantka uzyskała niezliczoną ilość pomiarów, wyników i obserwacji, a tym samym miała możliwość przeprowadzenia nowatorskich badań w skali światowej i określenia zagrożeń i źródła szkodliwych dla zdrowia ludzi mikroorganizmów;
- zastosowanie uzupełniających się metod w uzyskaniu różnorodności gatunkowej, tzn. analizy cech morfologicznych i obrazu mikroskopowego a następnie zastosowanie metod molekularnych, co umożliwiło Doktorantce dokładniejszą charakterystykę zanieczyszczenia mikologicznego filtrów i było bardzo dobrze zaplanowanym i przemyślanym krokiem badawczym;
- niezwykle bogata literatura przedmiotu, bardzo fachowo i trafnie dobrana do każdego badanego i analizowanego w rozprawie aspektu, co świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu i zrealizowaniu badań naukowych;
- podkreślam również dociekliwość naukową Doktorantki, której wyrazem jest podjęcie się badań w pewnym sensie pionierskich w Polsce i na świecie, stawiania sobie przez Doktorantkę trudnych celów i pokonywania ich dociekliwymi poszukiwaniami jak na prawdziwego badacza przystało, znaczenie przeprowadzonych badań jest niezwykle ważne dla zapewnienia skutecznej ochrony przed czynnikami biologicznymi użytkowników pojazdów, a tym samym dla zdrowia publicznego.

Wyniki badań zachęcają i prowokują do dyskusji, stąd moje pytania do Doktorantki. Bardzo proszę o odniesienie się do następujących zagadnień podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej:

1. W okresie wiosenno-letnim odnotowuje się wzrost liczby infekcji wywołanych przez grzyby. Pani badania dowiodły, że poziom zanieczyszczenia filtrów kabinowych grzybami pleśniowymi jest najwyższy w okresie letnio-jesiennym a gatunki przez Panią wykazane między innymi *Aspergillus fumigatus* i *Aspergillus nidulans* są bardzo zjadliwe i zdolne do wywołania poważnych infekcji. To co z transportem publicznym ludzi? Czy jest bezpieczny? Czy ma Pani wiedzę na temat regulacji prawnych dotyczących monitorowania instalacji klimatyzacyjnej w transporcie publicznym w Polsce? Czy w Europie są takie wytyczne? Czy obowiązują tylko harmonogramy serwisowania proponowane przez producentów pojazdów?
2. Napisała Pani w dyskusji, że niektóre badania sugerują, że w strefie umiarkowanej poziom zanieczyszczenia filtrów kabinowych wskazuje na większa liczbę i różnorodność mikroorganizmów w porównaniu do stref o wyższych temperaturach. Czy są już możliwe takie porównania, czy są prowadzone takie badania? Jakie jest Pani zdanie na ten temat?
3. W Rozporządzeniu Ministra Zdrowia z 2020 roku, na które Pani się powołuje, są wymienione dwa patogenne gatunki z rodzaju *Aspergillus*: *A. fumigatus* i *A. flavus,* czy może Pani podsumować ich znaczenie medyczne, czy jest się czego bać?
4. Czy ma Pani plany na kontynuację badań?

Podsumowując, uważam, że rozprawa doktorska mgr Eweliny Farian wnosi istotny wkład do rozwoju światowej mikologii i ma ogromne znaczenie dla zdrowia publicznego. Wkład Doktorantki w naukę i wiedzę w aspekcie mikologicznych zanieczyszczeń ze szczególnym uwzględnieniem grzybów z rodzaju *Aspergillus* uważam za znaczący i z pewnością zostanie doceniony przez specjalistów.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Eweliny Farian pt.” „Mikologiczne zanieczyszczenie filtrów w samochodowych instalacjach klimatyzacyjnych ze szczególnym uwzględnieniem grzybów należących do rodzaju *Aspergillus*” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w zakresie nauk biologicznych i zarówno pod względem merytorycznym i formalnym spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim przewidziane w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). W związku z tym stawiam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr Eweliny Farian do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki w Lublinie wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Farian stosowną nagrodą. Rozprawa doktorska zasługuje na wyróżnienie, o czym świadczą pionierskie, wielowątkowe, oryginalne badania naukowe, szerokie horyzonty oraz bardzo dobre rozeznanie w literaturze światowej.

Kraków, 18.06. 2023 Dr hab. Magdalena Nowak-Chmura, prof. UP

Uniwersytet Pedagogiczny
im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie ul.
Podchorążych 2, 30-084 Kraków
tel. 12 662 60 14
info@up.krakow.pl **www.up.krakow.pl**