

Prof. dr hab. Czesław Wawrzeńczyk

Wrocław, 15.12.2015

Katedra Chemii

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Ocena pracy doktorskiej Pani mgr Lucyny Balcerzak
pt. „*Wpływ pochodnych terpenoidowych na wzrost cyjanobakterii*”

Celem pracy doktorskiej Pani mgr Lucyny Balcerzak było zbadanie wpływu naturalnych związków terpenoidowych na rozwój cyjanobakterii żyjących w słodkowodnych zbiornikach wody. Zaplanowane badania miały również na celu ustalenie do jakich metabolitów przekształcane są terpenoidy przez te gatunki mikroorganizmów. Tak zaplanowane badania są uzasadnione głównie potrzebami środowiska naturalnego, a w zasadzie to potrzebami zachowania równowagi ekologicznej. W tym przypadku chodzi o kontrolę rozwoju cyjanobakterii wytwarzających groźne toksyny nie tylko dla organizmów żyjących w wodzie, ale również w stosunku do człowieka i innych zwierząt. Koncepcja kontroli tych szkodliwych dla środowiska mikroorganizmów za pomocą naturalnych związków izoprenoidowych jest bardzo zachęcająca. Związki te bowiem jak i ich metabolity nie są toksyczne dla środowiska, a więc go nie obciążają. Godne pochwały jest również poznanie struktur i właściwości biologicznych metabolitów wytworzonych przez te mikroorganizmy w procesach biotransformacji terpenoidów.

Przed przystąpieniem do prezentacji wyników uzyskanych w badaniach własnych mgr Lucyna Balcerzak omówiła podział terpenów i terpenoidów na podstawowe grupy oraz zaprezentowała właściwości biologiczne niektórych z nich. Przybliżyła czytającemu również mikroorganizmy, które badała – cyjanobakterie nazywane inaczej sinicami. Omówiła charakterystykę klasy *Cyanophyceae* do której należą cyjanobakterie. Zaprezentowała budowę ich komórek oraz warunki sprzyjające rozwojowi tych mikroorganizmów i niekorzystne skutki ich rozwoju w zbiornikach wodnych.

Na kolejnych stronach części literaturowej Autorka przedstawiła zagrożenia wynikające z obecności cyjanobakterii w otaczającym nas środowisku, a więc wytwarzanie przez nie chorobotwórczych cyjanotoksyn: hepatotoksyn, neurotoksyn i cytotoxyn. W następnym rozdziale omówiła również korzyści z obecności cyjanobakterii, oczywiście tych nie toksynotwórczych. Przedstawiła zastosowanie cyjanobakterii z gatunku *Arthrospira platensis* inaczej spiruliny w przemyśle kosmetycznym, a nawet spożywczym.

Omówiła również zastosowanie tych mikroorganizmów do usuwania środków powierzchniowo-czynnych, pestycydów i innych zanieczyszczeń środowiska, w tym również jonów metali ciężkich w postaci wodorotlenków. Mikroorganizmy te mogą zatem być pomocne w bioremediacji wód. Bioremediacja ta może odbywać się w procesach biotransformacji, które najczęściej poprzez procesy enzymatycznego utleniania, hydrolizy i izomeryzacji prowadzi do biodegradacji substancji obcych dla cyjanobakterii. Klasycznymi przykładami są procesy np. rozkładu n-fosfonometyloglicyny czy też składników ropy naftowej.

Autorka w części literaturowej omawia również procesy biotransformacji przedstawiając ich cechy charakterystyczne i skupiając się głównie na tych pozytywnych. Podkreśliła więc ich specyficzność substratową, chemoselektywność, enancjoselektywność, diastereoselektywność i regioselektywność. Na zakończenie tej części podała znane z literatury przekłady przekształceń terpenoidów przez cyjanobakterie, głównie przez szczepy z rodzaju *Synechococcus* sp. Biotransformacjom poddawano menton, karwon, limonen, tymol oraz produkt tych przekształceń limonenu diastereoizomeryczne epoksylimoneny. Najczęstszymi przekształceniami tych substratów były: redukcja, utlenianie w tym hydroksylacja i epoksydacja.

Przystępując do badań wpływu terpenoidów na cyjanobakterie: *Anabaena* sp., *Chroococcus minutus*, *Nodularia moravica* i *Spirulina platensis* Autorka przedstawia najpierw wyniki badań wpływu acyklicznych terpenoidów: cytralu, cytronelalu i cytronelolu. Spośród tych trzech związków najbardziej aktywny okazał się cytral, który w najniższych stężeniach (0,2-0,4 mmol/L) hamował wzrost *Spirulina platensis* oraz przy wyższych stężeniach *Nodularia moravica*. Cytronellal był natomiast aktywny na *Chroococcus minutus* oraz *Nodularia moravica*. Ostatni z badanych acyklicznych terpenoidów (\pm)-cytronelol jedynie przy najwyższych stężeniach (0,8-1,0 mmol/L) hamował rozwój *Nodularia moravica* i *Spirulina platensis*. Z dwóch monocyklicznych terpenowych ketonów S(+)-karwon był aktywny w stosunku do dwóch mikroorganizmów: *Spirulina platensis* i *Chroococcus minutus*, a (+)- i (-)-dihydrokarwon (jako mieszanina) był znacznie mniej aktywny nawet przy wyższych stężeniach. Nie wiem dlaczego mgr L. Balcerzak zaliczyła eugenol do terpenoidów. Należy on do grupy fenylopropanoidów o właściwościach chemicznych fenoli. Związek ten wykazał umiarkowaną aktywność w stosunku do *Spirulina platensis* i *Chroococcus minutus*.

Doktorantka badała również wpływ bicyklicznych terpenów: (+)-3-karenu i (+)- α -pinenu oraz terpenoidów: fenchonu i eukaliptolu na rozwój sinic. Wśród tych związków

znacznie bardziej aktywnymi były węglowodory terpenowe. (+)-3-karen hamował w znacznym stopniu rozwój *Spirulina platensis*, *Chroococcus minutus* i *Nodularia moravica*, a (+)- α -pinen *Nodularia moravica* i *Chroococcus minutus*.

Kolejne doświadczenia, które wykonała Doktorantka to badania wpływu terpenów i terpenoidów na hodowle mieszane trzech mikroorganizmów *Anabaena* sp., *Chroococcus minutus*, *Nodularia moravica*, które Autorka nazwała „konsorcjami”. Oceniając to doświadczenie z punktu widzenia zastosowania praktycznego związków terpenowych do ograniczenia lub zwalczania sinic trzeba przyznać, że ma ono sens, gdyż w warunkach naturalnych mikroorganizmy te żyją w takich właśnie mieszanych kulturach. Spośród badanych terpenów i terpenoidów tylko α -pinen przy niskich stężeniach hamował wzrost wszystkich mikroorganizmów wchodzących w skład „konsorcjum”. Przy wyższych stężeniach (0,8 -1,0 mmol/L) aktywne były jeszcze tylko cytonelal i cytronelol.

Kolejne doświadczenia mgr L. Balcerzak wykonała w odwrotnym układzie tzn. do jednego mikroorganizmu dodawała mieszaninę dwóch terpenoidów. Analiza wyników wskazała, że rozwój *Anabaena* sp. najbardziej ograniczały mieszaniny α -pinenu z (+)-3-karenem oraz cytronelalu z cytronelolem. Mieszaniny te hamowały również w znacznym stopniu rozwój *Chroococcus minutus*. Rozwój tego mikroorganizmu jeszcze bardziej efektywnie hamowała mieszanina eugenolu z S(+)-karwonem.

Ostatnia część badań przeprowadzonych przez mgr L. Balcerzak to biotransformacje wybranych acyklicznych, monocyklicznych i bicyklicznych terpenoidów stosowanych we wcześniej prowadzonych eksperymentach z sinicami. Spośród pięciu acyklicznych biotransformowanych terpenoidów: (\pm)-cytronelolu, geraniolu, (\pm)-cytronelalu, cytralu i (+)-linalolu tylko ten ostatni w kulturze *Spirulina platensis* ulegał przekształceniom. Produktem, który miałby powstawać według Doktorantki jest 2-metylo-2-winylo-5(2-hydroksy-prop-2-ylo)tetrahydrofuran. Jedynym dowodem na to, że jest to ten związek jest widmo GC-MS. W mojej opinii jest to zbyt słaby dowód. Do potwierdzenia tej struktury potrzebne byłyby dane spektroskopowe, szczególnie z widm NMR. Jeżeli jednak produkt końcowy tej biotransformacji jest prawdopodobny to nie wierzę, że produktem pośrednim jest diol o strukturze **42**. Na istnienie tego związku nie ma żadnych dowodów.

Biotransformacjom poddano również monocykliczne terpenoidy. Spośród tej grupy biotransformacjom w kulturze *Anabaena* sp. ulegały tylko (-)-mentol oraz (+)- i (-)-karwon. Mentol był utleniany do mentonu. Wspólną biotransformacją obu izomerycznych karwonów było uwodornienie α,β -wiązania podwójnego i w przypadku (+)-karwonu również redukcji

grupy karbonylowej w (+)-dihydrokarwonie. Budowę produktów ustalono na podstawie analizy GC-MS. Można było tę analizę poszerzyć stosując wzorce uzyskanych produktów. Wszystkie są związkami znanymi. Nie bardzo rozumiem w jaki sposób z (+)-karwonu (**17**) otrzymuje się (-)-dichydrokarwon (**18**).

Żaden z dziewięciu bicyklicznych terpenoidów poddanych biotransformacjom w kulturach badanych cyjanobakterii nie ulegał przekształceniom, a w przypadku tych bardziej lotnych (fenchon i karen), stwierdzono ich ubytek wskutek odparowywania z mieszaniny biotransformacyjnej.

W części doświadczalnej mgr L. Balcerzak podaje systematyczną przynależność mikroorganizmów będących przedmiotem badań, źródło ich pochodzenia oraz warunki hodowli laboratoryjnej. Następnie prezentuje struktury 24 terpenowych węglowodorów, alkoholi, ketonów, a nawet jednego oksymu i jego glicydowego wodoru. Nie bardzo wiem co w tym towarzystwie robi należący do fenylopropanoidów eugenol i jego octan.

W dalszej części tego rozdziału Doktorantka przedstawiła metody analityczne stosowane w pracy oraz ogólne procedury prowadzenia badań wpływu terpenoidów na wzrost i rozwój cyjanobakterii. Przedstawione są również metody prowadzenia biotransformacji wstępnych, preparatywnych, a nawet w fotobioreaktorze. Niestety wszystkie te procesy kończyły się tylko analizą mieszanin produktów za pomocą chromatografii cienkowarstwowej lub gazowej sprzężonej z detektorem spektrometrii mas.

Metody badawcze przedstawione w części doświadczalnej były dobrane właściwie do przeprowadzonych badań. Niedosyt mój budzi brak danych spektroskopowych (^1H i ^{13}C NMR) potwierdzających strukturę otrzymanych w biotransformacjach terpenoidów produktów. Przed oceną wartości naukowej uzyskanych wyników w trakcie realizacji celów pracy doktorskiej chciałbym zaznaczyć, że bardzo mi się podoba pomysł, aby związki naturalne zastosować do ograniczenia rozwoju mikroorganizmów szkodliwych dla naturalnego środowiska. Podoba mi się również podejście do problemu, a szczególnie próby ustalenia struktur metabolitów powstających ze stosowanych terpenoidów w wyniku ich biotransformacji w kulturach badanych mikroorganizmów.

Oceniając uzyskane wyniki trzeba podkreślić, że wnoszą wiele wartościowych informacji, szczególnie w obszarze badań biologicznych, a konkretnie o reakcjach sinic na związki terpenoidowe. Wyniki te dają nadzieję, że będzie można ograniczyć rozwój cyjanobakterii traktując ich kolonię roztworem naturalnych związków terpenoidowych. Druga część badań, biotransformacje robią wrażenie „niedokończonych”. Dlatego też wyniki trzeba traktować jako wstępne i przed opublikowaniem trzeba je uzupełnić, a niektóre

biotransformacje powtórzyć. O dużej wartości naukowej uzyskanych wyników świadczy to, że zostały już częściowo opublikowane w dwóch pracach oryginalnych oraz dwóch przeglądowych. Były również prezentowane na kilku konferencjach naukowych w postaci komunikatów.

Opracowanie tych wyników w postaci dysertacji oceniam również pozytywnie. Praca napisana jest dobrym i zrozumiałym językiem, chociaż czasami zbyt skrótowym. Opracowanie graficzne wyników w postaci wykresów jest bardzo dobre. Odnalazłem w pracy kilka powtórzeń tych samych akapitów, np. akapit rozpoczynający się: „cyjanobakterie charakteryzują się bardzo...” pojawia się na stronie 3 i 14. Bardzo nowatorskie, ale zarazem dziwne jest określenie odwirowywania „zwirowywaniem” (str. 84). W polskim nazewnictwie jest cytronelol i cytronelal, a nie citronellol i citronellal.

Podsumowując moją ocenę wartości naukowej uzyskanych przez mgr L. Balcerzak wyników i sposób ich przedstawienia w dysertacji stwierdzam, że praca doktorska pt. „*Wpływ pochodnych terpenoidowych na wzrost cyjanobakterii*” spełnia wymogi stawiane przez Ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym i przedstawiam Radzie Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej wniosek o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wojciech G.