

Dr hab. Przemysław Bernat, prof. UŁ
Uniwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej
i Biotechnologii UŁ

Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Natalii Zielonki
pt. " Biodegradacja związków fosfonowych przez grzyby"**

Opinia została sporządzona dla Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne w Politechnice Wrocławskiej zgodnie z decyzją podjętą na posiedzeniu w dniu 12 kwietnia 2023 r.

1. Opis ogólny

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Natalii Zielonki została napisana pod kierunkiem dr hab. Inż. Magdaleny Klimek-Ochab, prof. uczelni, będącej pracownikiem Katedry Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej.

Struktura pracy jest zgodna z ogólnymi zasadami i wymogami stawianymi rozprawom doktorskim.

Przedstawiona do oceny praca doktorska została prawie w całości napisana w języku polskim (poza streszczeniem w języku angielskim). Rozprawa ma strukturę typową dla prac doktorskich przygotowanych na zasadzie monografii. Obejmuje łącznie 212 stron

tekstu, w skład którego najważniejsze elementy to wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim oraz angielskim, wprowadzenie, cele pracy, materiały, metody, wyniki i dyskusja, podsumowanie i spis literatury.

Wprowadzenie jest dobrze przygotowanym rozdziałem pracy doktorskiej, bardzo obszerny przegląd literatury wprowadza w dziedzinę naukowych zainteresowań Doktorantki. Rozdział ten został podzielony na podrozdziały w których Doktorantka opisuje biogeochemiczny cykl obiegu fosforu i zwraca uwagę jak działalność człowieka wpływa na jego naturalny obieg. Autorka dużo miejsca poświęca zastosowaniu kwasów fosfonowych w różnych gałęziach gospodarki takich jak przemysł farmaceutyczny, czy tekstylny i wyróżnia powszechne stosowanie związków fosfonowych w środkach ochrony roślin. Tłumaczy także dlaczego warto zainteresować się procesami degradacji związków fosfonowych przez drobnoustroje. W związku z tym Autorka stara się zaznajomić czytelnika z w jaki sposób przebiega kontrola asymilacji fosforu przez drobnoustroje na poziomie molekularnym. Większość podanych informacji oparta jest o badania z udziałem najpopularniejszych modeli drobnoustrojowych - bakterii *Escherichia coli* i drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. W kolejnej części Doktorantka prezentuje najważniejsze informacje związane z budową kwasów fosfonowych oraz zaznajamia czytelnika z ich właściwościami. Doktorantka szczególną uwagę poświęca mikrobiologicznej biodegradacji kwasów fosfonowych przez bakterie i grzyby, podaje przykłady drobnoustrojów i charakteryzuje główne systemy enzymatyczne zaangażowane w procesy biodegradacji kwasu 2-aminoetylofosfonowego (2-AEP), N-fosfonometyloglicyny i kwasu fosfonoctowego. Ostatni podrozdział Autorka poświęca ważnej roli jaką odgrywają grzyby w środowisku i sposobach ich adaptacji do niskich temperatur.

Należy podkreślić, że Wprowadzenie zawiera liczne rysunki (16 pozycji) i 3 tabele ułatwiające zaznajomienie z informacjami związanymi z tematyką rozprawy doktorskiej.

Kolejna część rozprawy została poświęcona prezentacji celów pracy. Doktorantka zaprezentowała trzy główne cele pracy:

1. Wskazanie sposobu degradacji PMG przez drożdże *Solicoocozyma terricola* M 3.1.4.

2. Identyfikacja metabolitów różnicujących metabolizm grzybów strzępkowych z rodzaju *Penicillium* w zależności od zastosowanego źródła fosforu w podłożu hodowlanym oraz wskazanie zmian zachodzących w komórkach drobnoustrojów na skutek długotrwałej ekspozycji na działanie ksenobiotyku fosfonowego w środowisku.

3. Charakterystyka mechanizmu degradacji 2-AEP przez mezofilny szczep *Penicillium commune*.

Jako ich rozwinięcie zaproponowała siedem celów szczegółowych.

W kolejnych częściach Autorka wymieniła liczne materiały niezbędne do realizacji prezentowanych celów i zaprezentowała metodykę badań. Doktorantka przedstawia techniki stosowane do hodowli drobnoustrojów, sposoby przygotowań podłoży hodowlanych z dodatkiem glifozatu, kwasu fosfonooctowego lub ciliatyny. Doktorantka wyjaśniła także w jaki sposób przygotowywano eksperymenty mające na celu oznaczenie wybranych metabolitów metabolomu grzybów z rodzaju *Penicillium*. Dużo uwagi Autorka poświęca opisowi metod oznaczania aktywności enzymatycznych. Autorka nie zapomina także o opisie różnorodnych metod analitycznych użytych w pracy (m. in. techniki NMR i LC-MS).

Rozdział wyniki i dyskusja jest najbardziej rozbudowaną częścią pracy. Został podzielony na trzy główne części. W pierwszym etapie Doktorantka omówiła degradację N-fosfonometyloglicyny przez psychrofilne drożdże *S. terricola*. Wykazano, że glifozatu może być jedynym źródłem fosforu i azotu dla badanego szczepu, określono także jaki wpływ wywiera obecność coraz większych stężeń glifozatu na wzrost drożdży. Zaobserwowano także, że obecność ksenobiotyku wywiera wpływ na szybkość zużycia fosforu nieorganicznego. Stwierdzono także obecność metabolitu powstałego podczas degradacji glifozatu – kwasu aminometylofosfonowego w podłożu hodowlanym.

Kolejny etap recenzowanej pracy był poświęcony badaniom metabolomicznym grzyba strzępkowego *P. commune*, wykorzystującego fosforan nieorganiczny lub fosfonoocjan jako jedyne źródło fosforu. Stosując chromatograf cieczowy z dołączonym spektrometrem mas wykazano, że w obecności kwasu fosfonooctowego następuje stymulacja produkcji,

np. glutationu, hydroksyargininy, poliamin, kwasu moczowego czy ksantyny. Zaobserwowano także w ekstraktach otrzymanych z rozbitych biomas grzybów z rodzaju *Penicillium* hodowanych na podłożu z dodatkiem nieorganicznego fosforanu podwyższone stężenie tyrozyny, tryptofanu, glutationu i 3-hydroksymaślanu etylu. Ten fragment rozdziału został przez Doktorantkę uzupełniony w rysunki przedstawiające modele PCA oraz schemat ilustrujący podsumowanie szlaków metabolicznych u *P. commune* aktywowanych w komórkach w zależności od zastosowanego źródła P.

W ostatnim etapie Autorka opisuje badania dotyczące degradacji kolejnego fosfonianu – kwasu 2-aminoetylofosfonowego (ciliatyny) przez *P. commune* w podłożu płynnym. Na podstawie otrzymanych wyników opracowano krzywą wzrostu grzyba w obecności wybranych stężeń fosforu nieorganicznego i ciliatyny. Oznaczono także zawartość fosforu i ciliatyny w czasie hodowli. Wykorzystując ekstrakt otrzymany z grzybni Doktorantka wyznaczyła aktywność enzymatyczną transaminazy 2-AEP i hydrolazy aldehydu fosfonooctowego. Ten ostatni enzym wyizolowano, oczyszczono i otrzymane białko poddano trawieniu w celu sekwencjonowania. Zidentyfikowano pięć sekwencji aminokwasowych, które przyrównano do znanych sekwencji bakteryjnych hydrolaz aldehydu fosfonooctowego.

Doktorantka w swojej pracy korzystała z bardzo dużej ilości danych literaturowych, obejmujących 464 pozycje.

Na zakończenie rozprawy doktorskiej umieszczony jest opis aktywności naukowej Doktorantki, który obejmuje wykaz 3 prac naukowych tematycznie spójnych z recenzowaną pracą doktorską, w których Doktorantka jest pierwszym i korespondencyjnym autorem. Natomiast na całkowity dorobek naukowy Doktorantki składają się 3 publikacje oraz 4 doniesienia konferencyjne

2. Znaczenie i aktualność zagadnień zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej

Obecnie związki zawierające grupę fosfonową są powszechnie stosowane w rolnictwie. Glifozat jest składnikiem aktywnym najczęściej używanych na świecie herbicydów. Inne

związki zawierające grupę fosfonową znajdują zastosowanie m. in. w przemyśle farmaceutycznym i włókienniczym.

Duża częstotliwość użycia herbicydów z grupą fosfonową wywiera negatywne skutki na środowisko przyrodnicze. Uważa się, że tylko 0,1% substancji aktywnej pestycydów używanych w rolnictwie trafia wprost do zwalczanych organizmów, ponad 99% rozprasza się w ekosystemach i jest przenoszona na inne obszary. Jakkolwiek opisano wpływ pochodnych fosfonowych na bakterie informacje o sposobie oddziaływania tych związków na grzyby i szlakach ich biodegradacji u organizmów eukariotycznych są niewystarczające. Przedstawiciele tego królestwa stanowią istotny składnik mikroflory glebowej, skutecznie mogą się też adaptować do środowisk skrajnych. Grzyby cechuje szeroki wachlarz mechanizmów przetrwania związany z syntezą licznych metabolitów pierwotnych i wtórnych oraz różnorodnych enzymów.

Zastosowanie grzybów, w tym także drobnoustrojów ekstremofilnych do badań nad biologicznymi przemianami fosfonianów i sposobami odpowiedzi tych organizmów na niekorzystne warunki otoczenia może w przyszłości pomóc w planowaniu strategii eliminacji substancji toksycznych ze środowiska.

Wykonane przez Doktorantkę szeroko zakrojone badania oraz utrzymane wyniki w znacznym stopniu poszerzają wiedzę naukową w zakresie biodegradacji związków fosfonowych przez przedstawicieli grzybów strzępkowych i drożdży psychrofilnych.

3. Najważniejsze wyniki pracy doktorskiej

Do najważniejszych osiągnięć zaprezentowanych w pracy doktorskiej Pani mgr. Inż. Natalii Zielonki zaliczam:

- Wykazanie, że degradacja glifozatu przez drożdże *S. terricola* M 3.1.4 przebiega z tworzeniem kwasu aminometylofosfonowego i udziałem oksydoreduktazy glifozatu.
- Obserwacja, że w obecności kwasu fosfonooctowego w hodowli *P. commune* następuje synteza związków stymulujących odpowiedź komórki na niekorzystne warunki panujące w środowisku, np. glutationu, hydroksyargininy czy poliamin oraz aktywowanie szlaków

wykorzystujących związki stanowiące prekursory metabolitów wtórnych, takich jak kwas moczowy i ksantyna

- Zaobserwowanie, że profile metabolitów otrzymane z ekstraktów trzech gatunków grzybów z rodzaju *Penicillium* w zależności od zastosowanego źródła P mogą ulec zmianie. Stwierdzenie, że metabolizm *P. commune* i *P. funiculosum* S4 wykazuje cechy wspólne dla fosforanu nieorganicznego jako jedyne źródło fosforu (podwyższone stężenie tyrozyny, tryptofanu, glutationu i 3-hydroksymaślanu etylu) oraz obserwacja, że gdy w podłożu znajduje się fosfonian to metabolizm *P. commune* i *P. crustosum* S2 wykazuje więcej cech wspólnych (podwyższone stężenie UDP i adenozyiny oraz obniżony poziom ornityny, L-lizyny i 3-hydroksymaślanu etylu).
- Wykazanie aktywności dwóch enzymów zaangażowanych w rozkład kwasu 2-aminoetylofosfonowego transaminazy 2-AEP i fosfonatazy u *P. commune*.
- Stwierdzenie, że grzybowa fosfonataza jest enzymem metalozależnym i do swojej aktywności wymaga obecności jonów Mg^{2+}
- Na podstawie dopasowania sekwencji aminokwasowej wybranych bakteryjnych hydrolaz aldehydu fosfonoctowego do sekwencji otrzymanej z *P. commune* przypuszczenie, że grzybowa fosfonataza należy do nadrodziny dehydrogenaz halogenkwasów.

4. Walory pracy

Podsumowując, praca doktorska mgr inż. Natalii Zielonki przedstawia nową i przydatną wiedzę odnośnie biodegradacji związków fosfonowych przez wybrane gatunki drożdży i grzybów strzępkowych.

Część teoretyczna rozprawy doktorskiej obejmuje bardzo duży zakres publikacji z najnowszych lat (277 prac), w samej pracy zastosowano wiele różnorodnych metod badawczych. Duża część wyników została opublikowana w recenzowanych czasopismach. Wykonane eksperymenty zostały gruntownie przeanalizowane i wysunięto krytyczne

względem otrzymanych wyników wnioski. Rozprawa doktorska została napisana poprawnie pod względem redakcyjnym.

5. Uwagi

Po przeczytaniu otrzymanej rozprawy doktorskiej mam kilka uwag.

- Proszę stosować nazwy skrócone drobnoustrojów w tekście.
- Proszę dla ułatwienia odbioru treści używać akapitów.
- Zwraca moją uwagę tytuł pracy, czy sformułowanie „Biodegradacja związków fosfonowych przez grzyby” nie jest pojęciem zbyt ogólnym i nie mogłoby być doprecyzowane?
- Istotnym elementem pracy doktorskiej są eksperymenty opisujące ubytek związków fosfonowych w czasie wywołany aktywnością drobnoustrojów. Czy analizowano także potencjalny rozpad lub akumulację związków fosfonowych w kontrolach abiotycznych lub z autoklawowaną biomasą?
- Nie wszystkie rysunki umieszczone w pracy doktorskiej, które znalazły się w publikacji Doktorantki z roku 2019 są cytowane (Rysunki 21 i 22)
- Czy stosowane stężenia glifozatu są podobne do stężeń herbicydu w środowisku.
- Na podstawie analizy spadku zawartości glifozatu czy można stwierdzić zmniejszenie toksycznego wpływu herbicydu na drobnoustrój?
- Czy w przyszłości są planowane eksperymenty dotyczące degradacji glifozatu w glebie?
- Wykonując badania naukowe dużo niestety zależy od budżetu. Czy mogę prosić o informację o źródłach finansowania przedstawionych wyników?
- Analizę statystyczną dla części otrzymanych wyników można rozszerzyć stosując jednoczynnikową analizę wariancji a w kolejnym etapie zastosować testy post-hoc, które umożliwiają odpowiedzieć na pytanie, które z analizowanych grup różnią się między sobą.
- Wielokrotnie opisywano wywoływanie przez ksenobiotyki stresu oksydacyjnego w komórkach drobnoustrojów, w tym także modyfikacje profili fosfolipidów, których elementem składowym jest fosfor. Czy w przyszłości są planowane badania oceniające

poziom markerów stresu oksydacyjnego i zmiany w profilach fosfolipidów w komórkach grzybów poddanych działaniu np. glifozatu?

6. Wniosek końcowy

Podsumowując chciałbym zaznaczyć, że badania przeprowadzone przez mgr inż. Natalię Zielonkę przyczyniły się do poszerzenia wiedzy z zakresu oddziaływań związków fosfonowych na grzyby oraz mechanizmów biodegradacji tych związków przez wybrane drobnoustroje. Tematyka rozprawy doktorskiej jest aktualna i ważna. Doktorantka zrealizowała cele postawione w pracy. Oryginalne wyniki zostały poddane poprawnej analizie i wyciągnięto właściwe wnioski. Stwierdzam więc jako recenzent, że praca doktorska mgr inż. Natalii Zielonki, zatytułowana " Biodegradacja związków fosfonowych przez grzyby" spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz.U. z 2017 r. poz. 1789 z późn. zm.). Występuję zatem do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej z wnioskiem o dopuszczenie mgr inż. Natalii Zielonki do dalszych etapów postępowania o nadanie jej stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.

Z poważaniem,
Przemysław Bernat

