



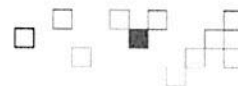
Lublin, 15.06.2023 r.

Dr hab. Anna Matuszewska, prof. UMCS
Katedra Biochemii i Biotechnologii
Instytut Nauk Biologicznych
Wydział Biologii i Biotechnologii
UMCS w Lublinie

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani mgr inż. Natalii Zielonki zatytułowanej:
„Biodegradacja związków fosfonowych przez grzyby”,
wykonanej pod kierunkiem
Pani dr hab. inż. Magdaleny Klimek-Ochab, prof. uczelni

Podstawą formalną wykonania niniejszej recenzji jest pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej, Pana dr hab. inż. Roberta Góry, prof. uczelni z dnia 18.04.2023 roku, w którym poinformował mnie, że decyzją Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne zostałam powołana na recenzenta ww. rozprawy doktorskiej.

Ilość szkodliwych ksenobiotyków w ekosystemach nieustannie się zwiększa, ze względu na dużą dostępność i wykorzystanie detergentów, pestycydów, farmaceutyków, rozpuszczalników czy ropy naftowej. Kwasy fosfonowe i ich pochodne stanowią systematycznie rosnący odsetek przemysłowo produkowanych substancji chemicznych, między innymi ze względu na fakt stosowania ich jako pestycydów. Najlepszym przykładem jest fosfonowa pochodna N-metyloglicyny (glifozot), wprowadzona na rynek pod nazwą handlową Roundup®. Jest to nieselektywny herbicyd o szerokim spektrum działania, stosowany na ogromną skalę ze względu na doskonałe właściwości fitotoksyczne. Mikrobiologiczna degradacja takich ksenobiotyków stanowi najważniejszą drogę ich eliminacji ze środowiska naturalnego, ponieważ produkty ich przemian unieruchomione w glebie lub osadowej materii organicznej, często stanowią zagrożenie toksykologiczne dla organizmów żywych. Procesy biodegradacji, mineralizacji i transformacji prowadzone przez mikroorganizmy są podstawą współczesnej

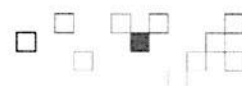


walki człowieka ze wzrastającą ilością ksenobiotyków wprowadzanych do środowiska. Dotychczas wykorzystywano głównie bakterie mezofilne, jednak badania dowodzą, że także grzyby i drożdże psychrofilne oraz psychrotroficzne mogą skutecznie przeprowadzać biodegradację ksenobiotyków. W ten nurt badawczy doskonale wpisuje się przedłożona mi do recenzji Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Natalii Zielonki zatytułowana: „Biodegradacja związków fosfonowych przez grzyby”, wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. inż. Magdaleny Klimek-Ochab, prof. uczelni, w Katedrze Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Autorka rozprawy podejmuje ważny temat dotyczący mechanizmów degradacji modelowych kwasów fosfonowych przez wybrane mikroorganizmy, takie jak psychrotolerancyjne drożdże *Solicozozyma terricola* M 3.1.4 oraz mezofilne pleśnie z rodzaju *Penicillium*.

Przedstawiona do oceny praca doktorska stanowi bardzo obszerny materiał, liczący aż 212 stron maszynopisu. Praca ma układ klasyczny charakterystyczny dla prac eksperymentalnych. Zawiera 464 pozycje piśmiennictwa, właściwie dobrane pod względem merytorycznym oraz 20 tabel i 45 rycin. Treść pracy została przez Autorkę podzielona na rozdziały poprzedzone spisem skrótów użytych w opracowaniu oraz spisem treści. Pod względem redakcyjnym oraz graficznym praca jest przygotowana bardzo starannie, choć w kilku miejscach zdarzyły się Autorce drobne błędy w postaci literówek, niepoprawnych końcówek wyrazów, co w żaden sposób nie umniejsza merytorycznej wartości recenzowanej pracy. Praca zakończona jest spisem dorobku naukowego Doktorantki.

Pracę rozpoczyna **Streszczenie**, w którym Autorka opisała krótko kwasy fosfonowe oraz zakres badawczy. Zamieściła również streszczenie w języku angielskim.

Rozdział **Wprowadzenie** (38 stron) został podzielony na 5 podrozdziałów. W pierwszym z nich Doktorantka przedstawiła cykl obiegu fosforu w ekosystemach lądowych i wodnych, zastosowania przemysłowe kwasów fosfonowych będących przedmiotem badań, genetyczną kontrolę asymilacji fosforu przez mikroorganizmy, oraz strategie utrzymania równowagi gospodarki fosforanowej w komórkach eukariotycznych na przykładzie grzybów. Doktorantka podkreśliła udział i znaczenie grzybów w strukturalnej i funkcjonalnej dynamice ekosystemów lądowych, co potwierdza zasadność podjętych badań. Zwróciła uwagę na fakt, że związki fosfonowe, oprócz substancji wytwarzanych przez człowieka, wchodzą również w skład substancji naturalnie występujących w organizmach żywych, co pozwala na efektywne poszukiwanie enzymów zaangażowanych w ich metabolizm. Jednym z takich enzymów jest opisana dosyć dokładnie przez Doktorantkę hydrolaza aldehydu fosfonoctowego (fosfonataza). Doktorantka przedstawiła wyczerpująco również inne enzymy oraz mechanizmy odpowiedzialne za metabolizm związków fosfonowych. Podsumowując uważam, że treść przeglądu literaturowego wskazuje na doskonałe przygotowanie merytoryczne Pani Natalii Zielonki do realizacji podjętych badań.



W **Celu pracy** Doktorantka zawarła krótkie uzasadnienie swoich badań oraz przejrzystość przedstawiła główne założenia planu eksperymentalnego będącego podstawą pracy. Sformułowała cel główny, którym było zbadanie mechanizmów degradacji modelowych kwasów fosfonowych przez wybrane szczepy grzybów: psychrotolerancyjne drożdże *Solicocozyma terricola* M 3.1.4 i mezofilne pleśnie z rodzaju *Penicillium* oraz porównanie ich z analogicznymi szlakami degradacji związków fosfonowych opisanych dla bakterii. Autorka precyzyjnie określiła również cele szczegółowe.

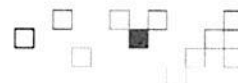
W rozdziale **Materialy** Autorka przedstawiła użyte do badań szczepy mikroorganizmów oraz zastosowane podłoża mikrobiologiczne. Warte podkreślenia jest wykorzystanie do badań izolantów glebowych, które zostały wyizolowane z próbek gleby z pól w pobliżu Wrocławia, na których stosowano herbicyd Roundup®, a więc ze środowiska, w którym mikroorganizmy miały kontakt ze związkami fosforoorganicznymi. W warunkach naturalnych drobnoustroje stykają się bowiem z wieloma zanieczyszczeniami, zarówno organicznymi jak i metalami ciężkimi, co zmusza je do adaptacji do występujących warunków środowiskowych. W związku z tym wyodrębnione ze środowiska izolanty często są zdolne do rozkładu toksycznych ksenobiotyków w obecności wysokich stężeń metali ciężkich i mogą stanowić podstawę do opracowania preparatów przydatnych szczególnie do usuwania uciążliwych zanieczyszczeń.

Opisując wykorzystane w pracy szczepy, tj. *Penicillium crustosum* S2 oraz *Penicillium funiculosum* S4 Doktorantka nie zaznaczyła, czy przeprowadzono identyfikację genetyczną wymienionych izolantów.

Rozdział **Metody** składa się z 6 podrozdziałów, w których Doktorantka opisała przygotowanie inokulum i biomasy mikroorganizmów wykorzystywanych do badań, przygotowanie roztworów glifozatu, kwasu fosfonooctowego i ciliatyny. Autorka przedstawiła metodykę oznaczania aktywności enzymatycznych bezkomórkowego ekstraktu grzybowego wobec 2-AEP, transaminazy 2-AEP oraz fosfonatazy. Scharakteryzowała również wykorzystane metody analityczne.

Biomasę szczepów wykorzystaną do badań przygotowywano w oparciu o hodowle płynne prowadzone z wykorzystaniem zmodyfikowanego podłoża CDM. Do ekstrakcji metabolitów Doktorantka wykorzystwała mieszaninę metanol/etanol w stosunku 1:1 (v/v).

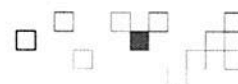
Na szczególną uwagę zasługuje fakt wykorzystania bardzo nowoczesnych badań metabolomicznych, które są integralnym podejściem, stanowiącym uzupełnienie wiedzy dotyczącej zależności między genotypem, a fenotypem określonego układu biologicznego. Badania te zostały przeprowadzone w ramach współpracy naukowej z Zespołem kierowanym przez prof. dr hab. Piotra Młynarza z Politechniki Wrocławskiej. Wykonano analizy metabolitów techniką LC-MS oraz analizy wielowymiarowe. Do badań metabolizmu pleśni z rodzaju *Penicillium*, zastosowano, strategię tzw. metabolicznego odcisku palca, która polega na jakościowym oznaczeniu zmian zachodzących w metabolizmie komórki. Jest to metoda niecelowana, wymagająca zastosowania czułych i komplementarnych technik analitycznych, aby możliwe było oznaczenie metabolitów o zróżnicowanych właściwościach



fizykochemicznych. Następnie konieczne jest zastosowanie zaawansowanych metod bioinformatycznych.

Kolejny rozdział **Wyniki i Dyskusja** Doktorantka podzieliła na trzy podrozdziały. Pierwszy z nich dotyczy degradacji N-fosfonometyloglicyny przez psychrotolerancyjne drożdże *Solicoccozyma terricola* M 3.1.4. W celu określenia kinetyki wzrostu szczepu w obecności PMG, Autorka zastosowała zmodyfikowane mineralne podłoże CDM, w którym stosowano różne stężenia glifozatu (PMG) w zależności od założeń eksperymentu, tak aby występował w stężeniu końcowym 2 mM gdy stanowił jedyne źródło fosforu, a 4 mM gdy był źródłem azotu lub azotu i fosforu. Uzyskane wyniki dowiodły, że glifozat zastosowany jako alternatywne źródło fosforu w podłożu skutecznie wspomagał wzrost badanych drożdży. Doktorantka zaobserwowała również, że *Solicoccozyma terricola* M 3.1.4, niezależnie od tego, czy w podłożu znajdował się Pi w stężeniu 2 mM czy PMG w różnych stężeniach, zawsze metabolizowały ok. 60% substratu zastosowanego w podłożu hodowlanym. Badany szczep drożdży wykazał odpowiedni potencjał enzymatyczny do wykorzystania PMG jako jedynego źródła azotu w obecności fosforanu nieorganicznego lub jako źródła azotu i fosforu jednocześnie. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka postawiła słuszną hipotezę, że w proces biodegradacji ksenobiotyku może być zaangażowana oksydoreduktaza glifozatu, która jest enzymem o zastosowaniu praktycznym. Ponieważ zdolność do degradacji PMG w obecności Pi jest powszechna u organizmów wykorzystujących GOX do rozkładu herbicydu Doktorantka zbadała tempo wzrostu oraz zużycie substratu w obecności fosforanu nieorganicznego. W celu potwierdzenia, że katabolizm glifozatu u badanego szczepu jest niezależny od obecności fosforanów w podłożu, przeanalizowała wpływ łatwo przyswajalnego źródła P na wykorzystanie PMG przez badany szczep psychrotolerancyjny. Analiza produktów biodegradacji ksenobiotyku w płynie pohodowlanym wykazała obecność kwasu aminometylofosfonowego, co pozwoliło udowodnić, że wykorzystanie substratu przez ten szczep zachodzi w wyniku zaangażowania szlaku oksydoreduktazy glifozatu (GOX). Podsumowując, stwierdzam, że pierwszy cel pracy został w pełni zrealizowany. Należy podkreślić, że jest to pierwsze doniesienie o procesie degradacji PMG przez psychrotolerancyjny szczep drożdży wyizolowany z gleby skażonej glifozatem gdy fosfonian był zastosowany jako źródło azotu i fosforu w podłożu hodowlanym.

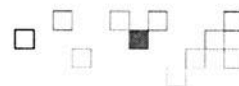
W dalszej części tego rozdziału Doktorantka przedstawiła wyniki badań metabolomicznych wybranych pleśni z rodzaju *Penicillium* zdolnych do degradacji kwasu fosfonooctowego stosowanego jako jedyne źródło fosforu w podłożu hodowlanym. Badania te Doktorantka przeprowadziła we współpracy z zespołem prof. dr hab. Piotra Młynarza z Politechniki Wrocławskiej. Analizę metabolomiczną przeprowadzono dla szczepu *Penicillium commune*, wytypowanego jako szczep modelowy dla poniższych badań oraz dwóch szczepów dzikich zdolnych do degradacji fosfonooctanu, które zostały wyizolowane z próbek gleby na których stosowano herbicyd Roundup®. Do szczegółowego porównania ze szczepem modelowym wybrano szczep dziki *P. funiculosum* S4, który posiadał najbardziej zbliżoną



charakterystykę zdolności degradacyjnych, w tym podobny poziom aktywności hydrolazy kwasu fosfonowego (PA) w ekstrakcie bezkomórkowym do szczepu modelowego, oraz ten, który wykazywał podobną kinetykę wzrostu na podłożu z kwasem fosfonooctowym (PA), ale z którego nie udało się uzyskać aktywnego względem fosfonianu ekstraktu bezkomórkowego: *P. crustosum* S2. W wyniku przeprowadzonych analiz dla szczepu modelowego na podłożu z fosfonooctanem wykazano, że jednym z metabolitów różnicujących składy ekstraktów bezkomórkowych uzyskanych z hodowli prowadzonych w różnych warunkach był glutation (GSH), który jest uznawany za jeden z kluczowych metabolitów u grzybów, a jego najbardziej fizjologiczna funkcja jest związana z odpowiedzią komórkową na niekorzystne warunki panujące w środowisku. Interesująca wydaje się także obecność hydroksyargininy w ekstrakcie bezkomórkowym szczepu *P. commune*, która jest produktem pośrednim procesu konwersji L-argininy i cząsteczki tlenu do cytruliny i tlenku azotu, katalizowanej przez syntazy tlenku azotu (NOS). Tlenek azotu (NO) odgrywa istotną rolę w metabolizmie komórki, działając jako cząsteczka sygnałowa, pozwalająca na kontrolowanie podstawowych procesów biologicznych w odpowiedzi na stres biotyczny i abiotyczny. Podsumowując ten etap badań Doktorantka stwierdziła, że obecność PA w podłożu hodowlanym prawdopodobnie skłania badany szczep do syntezy 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. Wyniki te potwierdzają fakt, że stres abiotyczny i biotyczny bezpośrednio wpływa na grzyby, zakłócając ich prawidłową fizjologię i homeostazę. Z uwagi na to, wykształciły one złożone systemy identyfikacji zmian warunków środowiskowych, jednocześnie wytwarzając systemy obronne pozwalające na ochronę komórki przed stresem środowiskowym.

Kolejne, przedstawione badania metabolomiczne dotyczyły izolantów środowiskowych. Ich analiza doprowadziła Doktorantkę do interesujących rezultatów. Analiza składów ekstraktów bezkomórkowych uzyskanych z biomasy hodowanej na podłożu zawierającym PA wykazała, że zarówno w porównaniu *Penicillium commune* z *P. crustosum* S2 oraz obu szczepów dzikich między sobą, zaobserwowano podobieństwa takie jak: podwyższone stężenie difosforanu urydyny i adenozyiny oraz obniżony poziom ornityny, L-lizyny i 3-hydroksymaślanu etylu u szczepu modelowego i *P. crustosum* S2. Na podstawie wyników uzyskanych ze wszystkich przeprowadzonych analiz Doktorantka stwierdziła, że *P. commune* i *P. funiculosum* S4 wykorzystują podobne strategie metaboliczne kiedy w podłożu zastosowano Pi jako jedyne źródło fosforu, natomiast gdy w podłożu znajduje się fosfonian to metabolizm szczepu modelowego i *P. crustosum* S2 wykazują więcej cech wspólnych.

W ostatnim podrozdziale Wyników i dyskusji Doktorantka przedstawiła rezultaty badań dotyczących degradacji kwasu 2-aminoetylofosfonowego (ciliatyny) przez szczep *Penicillium commune*. W tym celu Autorka przeprowadziła charakterystykę wzrostu badanego szczepu w obecności 2-AEP na podłożu mineralnym CDM, w którym stosowano różne stężenia ciliatyny w zależności od założeń eksperymentu. Uzyskane przez Autorkę dane wyraźnie wskazują, że



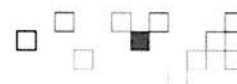
wykorzystanie fosfonianu na cele komórki u szczepu *Penicillium commune* następuje w sposób zależny od statusu fosforanowego komórki, a substrat fosfonowy zostaje wykorzystany dopiero po wyczerpaniu łatwo przyswajalnego źródła fosforu w podłożu hodowlanym.

Dalsze badania właściwości degradacyjnych szczepu mezofilnego poświęcone były głównie rozkładowi substratu w hodowlach, gdzie związek ten występował jako jedyne źródło fosforu. Doktorantka oznaczyła aktywność ekstraktu bezkomórkowego oraz przeprowadziła charakterystykę enzymów pochodzących ze szczepu *Penicillium commune*, a zaangażowanych w rozkład ciliatyny (transaminazy 2-AEP i fosfonatazy). Stwierdziła, że grzybowa transaminaza wykazuje większe powinowactwo do innego niż w przypadku bakterii, akceptora grupy aminowej (kwas szczawiooctowy), ale otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić, że proces odpowiedzialny za degradację 2-AEP przebiega w sposób podobny do opisanego u bakterii.

Doktorantka określiła również właściwości transaminazy 2-AEP z badanego szczepu, które obejmowały wyznaczenie optymalnego stężenia substratu, określenie specyficzności substratowej oraz wpływ temperatury i pH na aktywność enzymu. Na podstawie przeprowadzonej charakterystyki Autorka zasugerowała, że grzybowa transaminaza 2-AEP wykazuje pewne podobieństwo pod względem mechanizmu katalitycznego do członków rodziny aminotransferaz zależnych od fosforanu pirydoksalu pochodzenia bakteryjnego, a wykazanie rygorystycznej specyficzności substratowej tego enzymu udowodniło jego pojedynczą funkcję w komórce, w szlaku rozkładu 2-AEP.

Kolejnym scharakteryzowanym przez Doktorantkę enzymem była hydrolaza aldehydu fosfonooctowego. Na podstawie uzyskanych rezultatów Autorka zasugerowała, że grzybowa hydrolaza aldehydu fosfonooctowego wykazuje podobieństwo pod względem mechanizmu katalitycznego do członków rodziny dehalogenaz halogenokwasów (HAD) pochodzenia bakteryjnego. Enzym ten, podobnie jak transaminaza 2-AEP, wykazuje wąską specyficzność substratową, co świadczy o jego pojedynczej funkcji w komórce, w szlaku rozkładu aldehydu fosfonooctowego. Wąska specyficzność substratowa tych enzymów stanowi pewne ograniczenie ich ewentualnego zastosowania praktycznego.

Na wyodrębnienie i podkreślenie zasługuje także kolejna część rezultatów dotycząca oczyszczania grzybowej hydrolazy aldehydu fosfonooctowego ze szczepu *Penicillium commune*, ponieważ do tej pory nie udało się wyizolować tego enzymu ze szczepów eukariotycznych. W wyniku przeprowadzonej procedury oczyszczania enzymu Doktorantka uzyskała około 30-krotne oczyszczenie enzymu z wydajnością 59,5%. Autorka przedstawiła również wyniki sekwencjonowania uzyskanego preparatu białkowego w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas IBB PAN w Warszawie. W wyniku sekwencjonowania nie udało się zidentyfikować całej sekwencji aminokwasowej grzybowej hydrolazy, jednak na podstawie otrzymanych danych wskazano pięć, krótkich sekwencji o łącznej długości 47 reszt aminokwasowych, które przyrównano do sekwencji aminokwasowych bakteryjnych hydrolaz aldehydu fosfonooctowego. Wykazano obecność sekwencji aminokwasowych tożsamyh z tymi obecnymi w enzymach należących do nadrodziny dehydrogenaz halogenokwasów (HAD).



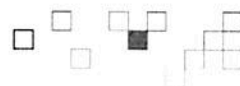
Ostatni rozdział rozprawy doktorskiej Pani Natalii Zielonki jest krótkim podsumowaniem wyników uzyskanych przez Doktorantkę.

Przy lekturze rozprawy doktorskiej mgr inż. Natalii Zielonki nasuwają się też pewne uwagi i pytania:

1. Na jakiej podstawie dokonano wyboru stężeń odpowiedniego kwasu fosfonowego dodawanego do podłoża hodowlanego, tj. 2mM lub 4mM?
2. Opisując w rozdziale Materiały (4.2.) wykorzystane w pracy szczepy, tj. *Penicillium crustosum* S2 oraz *Penicillium funiculosum* S4 Doktorantka nie zaznaczyła, czy przeprowadzono identyfikację genetyczną wymienionych izolantów.
3. W wykazie skrótów i oznaczeń stosowanych w pracy zabrakło wyjaśnienia skrótu „Pald”.
4. Badania metabolomiczne stanowiące duży zakres prac badawczych były przeprowadzone we współpracy z Zespołem kierowanym przez prof. dr hab. Piotra Młynarza z Politechniki Wrocławskiej. Są to bardzo nowatorskie i interesujące badania. Jaki udział w tym etapie prac miała Doktorantka?
5. W odczuciu recenzenta, ze względu na dużą ilość przeprowadzonych analiz i uzyskanych wyników, wygodniejsze dla czytającego byłoby podzielenie rozdziału Wyniki i dyskusja na dwa oddzielne.

Niniejsze uwagi, mają charakter marginalny i nie umniejszają zupełnie wartości rozprawy.

Oceniając merytorycznie przedłożoną do oceny rozprawę doktorską Pani mgr inż. Natalii Zielonki stwierdzam, że Autorka wykazała się bardzo dobrą znajomością podjętej tematyki badań. W sposób przemyślany wykonała i zaplanowała doświadczenia, wykazując się przy tym umiejętnością wykorzystania szerokiego spektrum nowoczesnej aparatury badawczej, uzyskując wartościowe wyniki. Otrzymane rezultaty mają zaś znaczący wkład w badania dotyczące udziału grzybów w biodegradacji ksenobiotyków. Są niezwykle istotne z punktu widzenia poznawczego i aplikacyjnego, gdyż otwierają perspektywy praktycznego zastosowania badanych szczepów w procesach biodegradacji herbicydów, insektycydów i fungicydów opartych na związkach fosfonowych.



Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do recenzji Rozprawa doktorska **Pani mgr inż. Natalii Zielonki** zatytułowana: „Biodegradacja związków fosfonowych przez grzyby” i wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. inż. Magdaleny Klimek-Ochab, prof. uczelni spełnia wymogi 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.).

W związku z powyższym, przedstawiam Wysokiej Radzie Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Natalii Zielonki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie mając na uwadze wysoką wartość naukową ocenianej pracy wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o jej wyróżnienie.

