

Politechnika Łódzka

Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska

Katedra Inżynierii Bioprocessowej

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Paulina Ksenia Stolarek

„Rola wybranych antyoksydantów w biodegradacji butylowych związków cyny przez mikroskopowy grzyb strzępkowy *Metarhizium robertsii*”

Promotor: dr hab. Przemysław Bernat, prof. UŁ

Podstawą opracowania recenzji jest pismo Pana prof. dr hab. Andrzeja Kruka Dziekana Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, z dnia 19 marca 2019 roku dotyczące przygotowania oceny wspomnianej wyżej rozprawy doktorskiej.

Mgr Paulina Ksenia Stolarek (z domu Siewiera) przedstawiła rozprawę doktorską zatytułowaną „Rola wybranych antyoksydantów w biodegradacji butylowych związków cyny przez mikroskopowy grzyb strzępkowy *Metarhizium robertsii*” w formie spójnego cyklu czterech artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym posiadających *Impact Factor*. Te artykuły to:

1. Siewiera P, Bernat P, Różalska S, Długoński J. 2015. Estradiol improves tributyltin degradation by the filamentous fungus *Metarhizium robertsii*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104:258-263. IF = 2,429, MNiSW = 30
2. Siewiera P, Różalska S, Bernat P. 2017. Efficient dibutyltin (DBT) elimination by the microscopic fungus *Metarhizium robertsii* under conditions of intensive aeration and ascorbic acid supplementation. *Environmental Science and Pollution Research*, 24:12118-12127. IF = 2,800, MNiSW = 30
3. Siewiera P, Różalska S, Bernat P. 2017. Estrogen-mediated protection of the organotin-degrading strain *Metarhizium robertsii* against oxidative stress promoted by monobutyltin. *Chemosphere*, 185:96-104. IF = 4,427, MNiSW = 35
4. Stolarek P, Różalska S, Bernat P. 2019. Lipidomic adaptations of the *Metarhizium robertsii* strain in response to butyltin compounds presence. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1861(1):316-326. IF = 3,438, MNiSW = 35

Ich sumaryczny *Impact Factor* wynosi 13,094, zaś łączna liczba punktów MNiSW jest równa 130. Te artykuły zostały uzupełnione o wprowadzenie do tematu rozprawy doktorskiej, sformułowanie

celu pracy, syntetyczne omówienie treści przedstawionych publikacji oraz podsumowanie wraz z wnioskami.

Również przedstawiony został pozostały dorobek naukowy Doktorantki w postaci artykułów naukowych oraz wystąpień konferencyjnych, a także źródła finansowania Jej badań.

Ocena merytoryczna pracy

W pierwszej kolejności chciałbym się odnieść do celowości wyboru tematu pracy. Związki cynoorganiczne, do których między innymi należą tributylocyna (TBT) i jej pochodne (dibutylocyna DBT, monobutylocyna MBT) są związkami chemicznymi powszechnie występującymi w różnych zastosowaniach przemysłowych oraz w produktach życia codziennego. Przede wszystkim związki cynoorganiczne są składnikiem farb okrętowych, ale występują także w polichloroku winylu oraz w wielu przedmiotach życia codziennego takich, jak folie i pergaminy do pieczenia, gąbki, odzież, artykuły sanitarne, zabawki dziecięce, tapety, dywany czy poduszki. Oczywiście sprawą jest, że należy w miarę możliwości unikać stosowania tych związków w technologii chemicznej i przetwórstwie materiałów chemicznych, ale i tak obecność związków cynoorganicznych jest zauważalna w środowisku, przede wszystkim w wodach morskich. Poziom stężeń tego typu związków jest niski, przez co usuwanie ich ze środowiska jest drogie i trudne. W takich przypadkach zwykle najlepiej sprawdzają się metody biologiczne. Usuwanie związków cynoorganicznych ze środowiska może być konieczne ze względu na takie negatywne efekty ich oddziaływania na człowieka, jak zaburzenia reprodukcyjne, zmiany neurobehawioralne, zaburzenia immunologiczne, zmiany hepatologiczne, toksyczność sercowo-naczyniowa, różnicowanie tkanki tłuszczowej i otyłość oraz hamowanie osteoklastogenezy.

Mgr Paulina Stolarek zaproponowała zastosowanie grzyba strzępkowego *Metarhizium robertsii* z kolekcji Instytutu Mikrobiologii i Immunologii UŁ do usuwania związków cynoorganicznych. We wprowadzeniu do rozprawy doktorskiej Doktorantka udowodniła w mojej opinii potrzebę badań nad usuwaniem związków cynoorganicznych. Również szczegółowy obszar badań, który przedstawiła, uważam za trafny i przede wszystkim nowatorski. Wiadomą sprawą jest, że biodegradacja czy biotransformacja tego typu ksenobiotyków jest ściśle związana z dostępem odpowiedniej ilości tlenu i właściwego potencjału oksydoredukcyjnego w komórkach mikroorganizmu odpowiadającego za jego rozkład jak *Metarhizium robertsii* IM 6519. Oczywiście zastosowanie odpowiedniej szybkości napowietrzania i zapewnienie właściwego procesu wymiany masy w bioreaktorze to jedna sprawa, ale próba zastosowania związków typu przeciwutleniacze (zmiatacze rodników) jak kwas askorbinowy, α -tokoferol oraz naturalne estrogeny to nowatorskie podejście to tego typu badań. Badanie wpływu związków cynoorganicznych na poziomie komórkowym (lipidom zastosowanego grzyba) to kolejny ważny element tych badań. Uważam

zatem wybór tematu pracy doktorskiej za trafny i potrzebny dla rozwoju badań podstawowych i ewentualnie aplikacyjnych.

Mgr Paulina Stolarek przedstawiła rozprawę doktorską obejmującą zrealizowanie trzech istotnych zagadnień badawczych, które postawiła sobie jako cel pracy. Są to:

1. Optymalizacja procesu biodegradacji dibutylocyny przez mikroskopowy grzyb strzępkowy *Metarhizium robertsii* IM 6519.
2. Analiza wpływu wybranych substancji o właściwościach antyoksydacyjnych na rozkład butylocyny związków cyny przez szczep *Metarhizium robertsii* IM 6519.
3. Badanie toksycznego oddziaływania di- i tributyllocyny (w i bez obecności witaminy C) na wybrane składniki lipidomu grzybowego szczepu *Metarhizium robertsii* IM 6519.

Teraz omówię to, co Doktorantka zaprezentowała w poszczególnych artykułach składających się na cykl publikacji przedstawionych jako rozprawa doktorska i odniosę się to tego, czy i w jakim stopniu zrealizowała Ona postawiony cel badawczy. Tu chciałbym zaznaczyć, że kolejność celów badań jest odmienna od chronologii artykułów.

Artykuł [2] opublikowany w *Environmental Science and Pollution Research* obejmował realizację celu pierwszego i częściowo celu drugiego niniejszej rozprawy doktorskiej. Doktorantka przedstawiła w nim wyniki badań biodegradacji związków cynoorganicznych, a dokładniej dibutylocyny (DBT), przez grzyb strzępkowy *Metarhizium robertsii*. Jak wynika z opisu w pierwszej kolejności zoptymalizowała ona podłoże wzrostowe, a następnie wykorzystała je do prowadzenia procesów biodegradacji DBT w kolbach wstrząsanych i w bioreaktorze zbiornikowym mieszadłowym. To podejście było słuszne, gdyż w ten sposób uzyskała dwa układy hodowlane o różnych poziomach dostępności tlenu. Badania te miały w znacznej mierze charakter badań wstępnych. Były przeprowadzone bardzo starannie i w mojej opinii Doktorantka doszła do słusznych niesprzecznych wniosków. Przede wszystkim ważne jest to, że udowodniła zdolność *Metarhizium robertsii* do biodegradacji związków cyny, zauważyła inny przebieg procesu (morfologia grzybni) pod wpływem intensywnego napowietrzania oraz mieszania i powiązała słusznie ten efekt z lepszym rozkładem DBT i MBT. Pokazała, że jest to proces typu kobiodegradacyjnego i udowodniła udział monooksygenaz cytochromu P₄₅₀ w biodegradacji, co pozostaje w związku z wpływem tlenu na przebieg procesu. Zauważyła też, że obecność DBT powoduje tworzenie bardziej owłosionych peletek szczególnie, jeśli dodane są antyoksydanty.

Jednakże w tej części badań nie uniknęła drobnych potknięć, głównie natury terminologicznej i interpretacji wyników badań. Przede wszystkim μ_{\max} to maksymalna właściwa szybkość wzrostu, a nie specyficzny współczynnik wzrostu drobnoustroju (w artykule jest to napisane prawidłowo: *maximum specific growth rate*, a w omówieniu publikacji źle). Również rys. 1 w artykule [2] (przebieg procesu w kolbach) oraz rys. 2 i 3 (przebieg procesu w bioreaktorze)

wyraźnie pokazują na różną dostępność tlenu w obu układach hodowlanych. Prawie 48-godzinny liniowy wzrost biomasy w kolbach wyraźnie wskazuje na limitację tlenem. Tu szkoda, że nie ma punktów w przedziale od 0 do 24 h. Grzyby strzępkowe rosną liniowo, kiedy pojawiają się opory ruchu masy związane z transportem tlenu do komórek. Tego Doktorantka nie zauważyła, chociaż wnioski na temat dostępności tlenu w hodowlach są całkowicie słuszne. W bioreaktorze ten wzrost już był nieliniowy (szybszy niż liniowy), choć nie potrafię ocenić na podstawie wykresów, czy w pełni wykładniczy. Dodatkowo nasuwają się tutaj dwa zagadnienia do dyskusji:

1. Z pewnością morfologia grzybni miała znaczenie z punktu widzenia dostępności tlenu do grzybni, jednak czy tylko lepsze napowietrzanie w bioreaktorze było przyczyną utworzenia bardziej owłosionych i luźniejszych peletek? Co z oddziaływaniem naprężeń mechanicznych związanych z mieszaniem? Ponieważ zarówno kolby jak i bioreaktor inokulowane były w pełni rozwiniętą morfologicznie grzybnią (patrzac na czas przygotowania prekultury), czy można byłoby zobaczyć na obrazach, jaka forma morfologiczna była wprowadzana do hodowli. Jeśli były to już uformowane peletki, to mogły one ulec przejściu w formę bardziej owłosioną pod wpływem naprężeń ścinających.
2. Pomimo, że biomasa szybciej rosła w bioreaktorze, to jednak jej końcowe maksymalne stężenie w fazie stacjonarnej jest niższe w procesach bioreaktorowych niż w tych prowadzonych w kolbach, co widać w Tabeli 1 z artykułu [2]. Czy jest na to jakieś wyjaśnienie?

Podsumowując uważam, że Doktorantka dobrze zrealizowała ten cel rozprawy.

Artykuł [2] również obejmował częściowo cel drugi, czyli analizę wpływu wybranych substancji o właściwościach antyoksydacyjnych na rozkład butylowych związków cyny przez szczep *Metarhizium robertsii* IM 6519. Doktorantka zastosowała kwas askorbinowy i α -tokoferol jako przeciwutleniacze, uzyskując lepsze usunięcie DBT i MBT w przypadku kwasu askorbinowego oraz tylko DBT w przypadku α -tokoferolu. Tu nasuwa się kolejne pytanie do dyskusji:

3. Kobiodegradacja związków cynoorganicznych jest zależna od ilości tlenu. Okazało się, że kwas askorbinowy znacząco poprawia biodegradację związków cynoorganicznych, ale z drugiej strony kwas askorbinowy sam utlenia się wskutek obecności tlenu w podłożu i przez to zmniejsza się jego ilość. Ale przede wszystkim zmniejsza on stężenie tlenu w podłożu. Kwas askorbinowy występuje wszak w roztworach odtleniających do kalibracji elektrod tlenowych. Czy nie ma tu pewnej sprzeczności? Tlen potrzebny do biodegradacji jest jednocześnie usuwany z podłoża przez kwas askorbinowy. Czy da się pozytywne działanie kwasu askorbinowego wyjaśnić na poziomie komórkowym?

Artykuł [3] opublikowany w *Chemosphere* to dalsza realizacja drugiego celu rozprawy doktorskiej wpływu antyutleniaczy na biodegradację DBT przez *Metarhizium robertsii*. W tym przypadku były to naturalne estrogeny estron (E1) i estradiol (E2). Doktorantka wykazała negatywny efekt E1 i E2 na degradację DBT, poziom tego związku był wyższy niż w kontroli, ale jednocześnie stężenie produktu rozkładu dibutylocyny, czyli MBT było niższe niż w kontroli. Jednakże w tej pracy znacznie dokładniej Doktorantka przyjrzała się mechanizmom rządzącym procesem biodegradacji. Przede wszystkim wykazała to, że estrogeny naturalne współzawodniczą z DBT o miejsca aktywne enzymów z cytochromem P₄₅₀, co wyjaśnia pogorszenie wydajności procesu biodegradacji.

Dodatkowo Doktorantka zajęła się nieczęsto badanym zagadnieniem obecności reaktywnych form tlenu (RFT) w obecności DBT w jej układzie badawczym. Wykonała detekcję anionorodnika ponadtlenkowego, nadtlenu wodoru oraz rodnika tlenku azotu. Bardzo ważnym osiągnięciem okazało się, że MBT jest silniejszym induktorem reaktywnych form tlenu. Ostatecznie okazało się, że funkcją estrogenów naturalnych było zmiatanie reaktywnych form tlenu (RFT) i przez to łagodzony był stres oksydacyjny dla badanego grzyba strzępkowego, zaś ani katalaza ani dysmutaza nadtlenkowa nie wykazywały zmian aktywności niezależnie od dodania bądź nie naturalnych estrogenów czy DBT.

Wывód w tym artykule jest bardzo logiczny, bardzo dobre wrażenie robią zawansowane techniki analityczne. Ponieważ do oznaczania obecności RFT wykorzystywane były techniki obrazowania, chciałbym, żeby Doktorantka pokazała na prezentacji przykładowe obrazy, które posłużyły obliczaniom przedstawionym w Tabeli 1 artykułu [3].

Badania zawierające się w punkcie 2 zostały następnie rozszerzone o tributyllocynę (TBT), którego pośrednimi produktami rozkładu są DBT oraz MBT (artykuł [1] opublikowany w *International Biodeterioration and Biodegradation*). Do hodowli *Metarhizium robertsii* z TBT dodawany był tylko estradiol E2. Badania prowadzone były w tym przypadku w hodowli wstrząsanej na podłożu Sabouraud. Doktorantka przede wszystkim wykazała, że dodatek E2 obniża o 30% stężenie TBT w podłożu i powoduje przekształcenie TBT w DBT i MBT. Zaobserwowała również gwałtowny spadek zawartości estradiolu w podłożu. Efekt oddziaływania związków cynoorganicznych na badany grzyb strzępkowy w obecności lub bez estradiolu określiła poprzez badanie profilu fosfolipidowego. Mając wiedzę, że związki cynoorganiczne wywołują stres oksydacyjny u *Metarhizium robertsii*, udowodniła działanie antyoksydacyjne estradiolu, wykazując większy przyrost biomasy, a na podstawie analizy fosfolipidów pokazała, że efekt oddziaływania TBT polega na niszczeniu integralności błony komórkowej. Wyciągnęła wniosek, że poprzez obniżenie stężenia aktywnych form tlenu dzięki obecności E2 polepszona została biodegradacja TBT.

Wyniki badań przedstawione w publikacji są bardzo logiczne i spójne, ale nasuwa się tutaj kolejne pytanie do dyskusji:

4. Na ile wyniki przedstawione w tej publikacji są porównywalne z dwiema poprzednimi: chodzi tu o zmianę podłoża (Sabouraud, a nie mineralne) i tlenowych warunków hodowli (słabiej napowietrzane kolby wstrząsane)?

Ostania praca [4] opublikowana w *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* obejmowała zagadnienia związane z oddziaływaniem TBT i DBT na wybrane składniki lipidomu grzybowego w obecności bądź nieobecności kwasu askorbinowego. Badania te prowadzono w bioreaktorze zbiornikowym mieszadłowym z napowietrzaniem, a zatem warunki pod względem oksydoredukcyjnym sprzyjały rozkładowi związków cynoorganicznych. W celu określenia wpływu TBT i DBT na lipidom Doktorantka badała zarówno jakościowo i ilościowo fosfolipidy, sfingolipidy, acyloglicerole i sterole komórkowe *Metarhizium robertsii*.

Doktorantka, stosując zaawansowane techniki LC MS/MS, zidentyfikowała 17 lipidów neutralnych, tyleż sfingolipidów oraz ergosterol. Ważnym wnioskiem było stwierdzenie wzmożonej syntezy fosfolipidów i sfingolipidów pod wpływem związków cynoorganicznych oraz hiperpolaryzacji błony komórkowej pod wpływem TBT. Pokazała również, że kwas askorbinowy pozwala zneutralizować negatywny wpływ związków cynoorganicznych na błony komórkowe *Metarhizium robertsii*. Ostatecznie Doktorantka zaproponowała biomarkery obecności DBT/TBT i witaminy C, którymi się okazały się, między innymi, stosunek fosfatydylocholin do fosfatydyloetanolamin, stosunek kwasów tłuszczowych C₁₆ do C₁₈, wartość indeksu wiązań podwójnych czy poziom ergosterolu.

Spośród wszystkich prac w cyklu publikacji tę pracę oceniam szczególnie wysoko, dzięki bardzo dokładnym badaniom na poziomie komórkowym z zastosowaniem zaawansowanych technik analitycznych oraz bardzo dobrej analizy statystycznej wyników pracy.

Na koniec tej części recenzji, stwierdzam, że bardzo dobre wrażenie robi zastosowanie zaawansowanych technik analitycznych przez Doktorantkę, chromatografia, spektrometria mas analiza obrazu (obrazy w świetle widzialnym i fluorescencji). To wszystko bardzo dobrze świadczy w warsztacie badawczym mgr Pauliny Stolarek.

Z pewnością niniejsza praca doktorska wnosi nową wiedzę w badaniach podstawowych nad mechanizmami rządzącymi biodegradacją związków ksenobiotycznych w tym przypadku cynoorganicznych. Być może zdobyta w tych badaniach wiedza w przyszłości znajdzie zastosowania praktyczne.

Ocena formalna pracy

Praca jest przygotowana bez zarzutu, na uwagę zwraca bardzo dobry styl pisania w języku polskim, również tłumaczenie angielskie streszczenia pracy jest na dość dobrym poziomie. Artykuły naukowe zostały przygotowane bardzo starannie. W streszczeniu przydałoby się więcej materiału ilustracyjnego (obrazy grzybni z badań), który często nie może się pojawić w artykułach naukowych ze względu na brak miejsca.

Podsumowanie i ostateczne wnioski

W ocenie niniejszej rozprawy doktorskiej pojawiło się kilka uwag o charakterze dyskusyjnym, ale nie mają one wpływu na moją bardzo wysoką ocenę niniejszej rozprawy doktorskiej. Chciałbym tu jeszcze dodać, że dodatkowy dorobek Doktorantki poza cyklem publikacji jest również bardzo dobry (publikacje z IF).

Zatem, ostatecznie stwierdzam, że w mojej ocenie rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Kseni Stolarek spełnia wymogi określone w stosownych przepisach 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 wnioskuję do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Pauliny Kseni Stolarek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie składam wniosek o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej biorąc pod uwagę:

- wysoką jakość prowadzonych badań i sposób ich przedstawienia,
- formę przedstawionej rozprawy doktorskiej (4 publikacje w bardzo dobrych czasopismach z *Impact Factor*),
- dobry dodatkowy dorobek naukowy Doktorantki (6 publikacji w czasopismach z *Impact Factor*).

Włodzisław Buzukojc