

dr hab. inż. Marcin Bizukojć, prof. PŁ

Łódź, 12.03.2018 r.

Politechnika Łódzka

Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska

Katedra Inżynierii Bioprocessowej

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Katarzyna Zawadzka

„Mikrobiologiczna degradacja wybranych związków N-heterocyklicznych o działaniu farmakologicznym”

Promotor: prof. dr hab. Katarzyna Lisowska

Promotor pomocniczy: dr Aleksandra Felczak

Podstawą opracowania recenzji jest pismo Pana prof. dr hab. Andrzeja Kruka Dziekana Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, z dnia 25.01.2018 roku dotyczące przygotowania oceny wspomnianej wyżej rozprawy doktorskiej.

Mgr Katarzyna Zawadzka przedstawiła rozprawę doktorską zatytułowaną „Mikrobiologiczna degradacja wybranych związków N-heterocyklicznych o działaniu farmakologicznym” w formie spójnego cyklu czterech artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym posiadających *Impact Factor*. Te artykuły zostały uzupełnione o wprowadzenie do tematu rozprawy doktorskiej, sformułowanie celu pracy, wyliczenie zastosowanych technik badawczych, syntetyczne omówienie treści przedstawionych publikacji oraz podsumowanie wraz z wnioskami. Również przedstawiony został pozostały dorobek naukowy Doktorantki oraz oświadczenia współautorów artykułów naukowych zaliczonych do cyklu. Już w tym miejscu recenzji chciałbym zauważyć, że Doktorantka ma większościowy (powyżej 75%) udział w powstaniu tych czterech artykułów i jest w nich pierwszym autorem, co bardzo dobrze świadczy o Jej umiejętnościach prowadzenia badań naukowych oraz pisania publikacji.

Ocena merytoryczna pracy

W pierwszej kolejności chciałbym się odnieść do celowości wyboru tematu pracy. W dzisiejszych czasach nie ma wątpliwości, że wiele zsyntezowanych przez człowieka organicznych związków chemicznych o szerokich zastosowaniach zarówno w przemyśle chemicznym, spożywczym czy kosmetycznym jest ksenobiotykami. Są one często

komercyjnymi produktami tych gałęzi przemysłu i znajdują zastosowanie w codziennym życiu jako kosmetyki, środki powierzchniowo czynne, barwniki, substancje słodzące czy środki lecznicze. Z faktu, że są one ksenobiotykami wynika to, że ich rozkład biologiczny może być utrudniony, wolniejszy, niepełny, a czasem wręcz niemożliwy, kiedy przedostaną się one do środowiska wodnego czy glebowego. Co więcej wiele z tego typu substancji podejrzewa się, bądź jest to już pewne, że oddziałują one na układ hormonalny zwierząt i ludzi. Są one wtedy tak zwanymi modulatorami hormonalnymi (*endocrine disrupting compounds, EDCs*).

Mgr Katarzyna Zawadzka do swoich badań wybrała dwa związki z grupy N-heterocyklicznych węglowodorów aromatycznych: karbazol oraz karwedilol. Karbazol, będący pochodną wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA), a dokładniej N-podstawioną pochodną fluorenu, jest bez wątpienia substancją negatywnie oddziałującą na środowisko i zdrowie człowieka, chociaż w przyrodzie pojawia się w sposób naturalny w paliwach kopalnych. Jego szerokie zastosowania w przemyśle chemicznym i farmaceutycznym jako prekursora syntez organicznych sprawiają, że może się on stać uciążliwym zanieczyszczeniem środowiska. Karwedilol, który jest pochodną tegoż karbazolu, należy do leków z grupy tzw. β -blokerów. Nie są one w pełni metabolizowane przez człowieka po ich zażyciu w terapii nadciśnienia tętniczego i teoretycznie w ten sposób mogą przedostawać się do środowiska.

Istnieje dobrze ugruntowana wiedza, że grzyby strzępkowe ze względu na swój bogaty metabolizm mają zdolność do transformowania (przede wszystkim utleniania) związków o charakterze aromatycznym. Doktorantka postanowiła zbadać tę ich zdolność wobec karbazolu i karwedilolu. Uważam, że zarówno we wprowadzeniu do tematu rozprawy doktorskiej, jak i w przedstawionym cyklu artykułów naukowych Doktorantka wyraźnie udowodniła potrzebę zbadania procesów biotransformacji tych dwóch związków organicznych przez grzyby strzępkowe.

Rozprawa doktorska obejmuje kilka istotnych zagadnień badawczych, które zostały szczegółowo i jasno przedstawione w celu pracy, a są to:

1. skринing grzybów strzępkowych w celu poszukiwania takiego gatunku, który posiadałby zdolność metabolizowania zarówno karbazolu, jak i karwedilolu,
2. ocena zdolności biotransformacji karbazolu i karwedilolu wraz z określeniem mechanizmów rządzących tymi procesami,
3. zbadanie oddziaływania tych dwóch związków organicznych na osłony komórkowe mikroorganizmów wybranych do ich biotransformacji oraz przeprowadzenie testów

toksyczności zarówno dwóch badanych związków, jak i produktów ich biotransformacji

Teraz krótko omówię to, co Doktorantka zaprezentowała w poszczególnych artykułach składających się na cykl publikacji przedstawionych jako rozprawa doktorska.

Artykuł P1 opublikowany w *Environmental Science and Pollution Research* obejmuje badania polegające na poszukiwaniu grzybów strzępkowych między innymi z rodzajów *Cunninghamella*, *Aspergillus* czy *Metarhizium* posiadających zdolności do biotransformacji (hydroksylacji) karbazolu. Po znalezieniu odpowiednich szczepów Doktorantka zbadła usuwanie karbazolu przez trzy szczepy z rodzaju *Cunninghamella*. Oprócz ilościowego określenia takich podstawowych wielkości opisujących proces wzrostu grzybni w obecności karbazolu, jak stopień usunięcia (biotransformacji) badanego związku oraz jego wpływ na wzrost biomasy grzybni, Doktorantka jeszcze wykryła jeszcze produkty biotransformacji (hydroksylowane pochodne), zbadła toksyczność podłoża pohodowlanego oraz przeanalizowała profil fosfolipidowy badanych grzybów strzępkowych, udowadniając jego zmianę pod wpływem karbazolu. Oceniam tę publikację P1 bardzo wysoko przede wszystkim ze względu na kompleksowe podejście do badań nad wybranym związkiem chemicznym oraz zastosowanie szerokiego spektrum technik analitycznych.

W dalszych badaniach Doktorantka prowadziła skryning 10 szczepów grzybów strzępkowych w kierunku biotransformacji karwedilolu, sugerując zastosowanie *Cunninghamella echinulata* do tego procesu.

W artykule P2 opublikowanym w *Chemosphere* Doktorantka opisała podobne pod względem stosowanej metodyki (jak w artykule P1) badania nad usuwaniem karwedilolu przez *Cunninghamella echinulata*. Określone zostały oczywiście stopnie biotransformacji karwedilolu, profil fosfolipidowy oraz, co najcenniejsze, znalezione produkty jego biotransformacji. Szczególnie wysoko oceniam tę część artykułu P2, w której Doktorantka przedstawiła bardzo szczegółową analizę biotransformacji karwedilolu przez *Cunninghamella echinulata*, wykorzystując dane z widm masowych. W tym artykule przedstawione zostały szlaki biotransformacji karwedilolu przez badany grzyb strzępkowy. Uważam, że te dane mogłyby być włączone do jednej z internetowych baz danych metabolizmu, jak Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes lub University of Minnesota Biodegradation and Biotransformation Database.

Artykuł P3 (*International Biodeterioration and Biodegradation*) jest podobny metodologicznie artykule P2 i dotyczy biotransformacji karwedilolu przez inny grzyb

strzępkowy *Cunninghamella elegans*. Również na szczególną uwagę zasługuje tutaj identyfikacja produktów biotransformacji karwedilolu. Również uważam, że te dane powinny się znaleźć w wyżej wspomnianych internetowych bazach danych. Bardzo ważne i cenne jest również udowodnienie mechanizmu hydroksylacji karwedilolu z udziałem cytochromu P₄₅₀.

Ostatnia praca P4 (*International Journal of Antimicrobial Agents*) nieco odbiega tematycznie od poprzednich, co nie oznacza, że jest niespójna w cyklu. Doktorantka zbadła tu właściwości antybiotyczne (bakteriobójcze) karwedilolu jednocześnie poszukując produktów rozkładu tego związku przez bakterie. Były one inne niż w przypadku grzybów strzępkowych i w mojej opinii te badania są dobrym punktem wyjścia do kolejnych prac na temat bakteryjnej biodegradacji tego związku. Na pochwałę zasługują również szczegółowe badania profili fosfolipidowych bakterii oraz składu kwasów tłuszczowych w warunkach ich wzrostu w obecności karwedilolu. Zastosowane metody badawcze były podobne jak w poprzednich artykułach, a podejście do badań kompleksowe.

Podsumowując tę część recenzji, uważam, że artykuły przedstawione jako spójny cykl publikacji są napisane na bardzo wysokim poziomie, tematyka badawcza aktualna. Dobrze został sformułowany cel rozprawy doktorskiej, a mgr Katarzyna Zawadzka doszła do konkretnych i jasnych wniosków. Dodatkowo chciałbym jeszcze raz podkreślić bardzo wysoką jakość prowadzonych badań przez Doktorantkę pod względem zastosowanych technik analitycznych. Umiała ona wykorzystać szereg najnowocześniejszych aparatów badawczych jak chromatografy cieczowe i gazowe sprzężone ze spektrometrami mas, mikroskop konfokalny, czy też techniki biologii molekularnej.

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 dobrym poziomie. Można tylko zauważyć jeden brak. Rozumiem, że syntetyczny opis tego, o czym traktują publikacje w cyklu powinien być zwięzły i syntetyczny, ale obecność rysunku ze strukturą badanych związków byłaby w tym miejscu przydatna. Takie rysunki rzadko przedstawia się w publikacjach, ale wiadomo, że miejsce w czasopismach naukowych jest ograniczone.

Zauważyłem też kilka drobnych błędów edycyjnych. Na rys. 1 w artykule P3 sucha biomasa chyba powinna być w g/l. Na tym samym rysunku zauważyłem prezentację wzrostu biomasy w postaci wykresu słupkowego. Takie przedstawienie uważam za niezbyt czytelne (także rys. 1 w publikacji P2). Wzorcowo zmiany stężenia biomasy w czasie wyglądają na rys. 1 w artykule P1.

Uwagi do rozprawy doktorskiej

Jak już kilka razy wspominałem, rozprawę doktorską mgr Katarzyny Zawadzkiej oceniam bardzo wysoko. Chciałbym jednak przedstawić kilka uwag o różnym charakterze. Nie są one krytycznymi zarzutami wobec Doktorantki. Mają one albo związek z terminologią naukową, albo mają służyć wywołaniu dyskusji na publicznej obronie. Chciałbym, żeby Doktorantka odniosła się na publicznej obronie do uwag dyskusyjnych.

Uwaga związana z używaną terminologią naukową

Mój pierwsza uwaga wynika głównie z tego, że reprezentuję nauki techniczne i przez to nie za bardzo zgadzam się ze sformułowaniem „dynamika eliminacji karbazolu”. Doktorantka użyła tego sformułowania w syntetycznym omówieniu wyników oraz w artykułach. To, co zostało przedstawione jako dynamika, jest tylko pokazaniem stopnia usunięcia a właściwie biotransformacji karbazolu lub karwedilolu w różnych godzinach procesu wyrażonym w procentach jego pozostałości (np. Fig. 2, w publikacji P1). Ta uwaga dotyczy również tego, co Doktorantka nazwała „dynamiką wzrostu biomasy”. Doktorantka w artykule P1 i innych pokazuje po prostu zmiany zawartości biomasy w badanej hodowli w czasie. Dynamika zjawiska to odpowiedź jakiegoś układu będącego w stanie równowagi (ustalonym) na bodziec wyprowadzający tenże układ ze stanu równowagi (ustalonego), albo dochodzenie w czasie badanego układu do stanu ustalonego (równowagi).

Uwagi dyskusyjne

Doktorantka wybrała wartości stężenia badanych związków organicznych w podłożach hodowlanych na poziomie 200 mg/l dla karbazolu i 20 mg/l dla karwedilolu, ale jestem ciekaw, i tu prosiłbym o próbę znalezienia takich danych w literaturze, oczywiście jeśli to możliwe, jakie stężenia karbazolu i karwedilolu można znaleźć w próbach pochodzących zarówno z środowiska (np. gleba, osady denne zbiorników wodnych), jak i w instalacjach do oczyszczania ścieków: (osady ściekowe), ścieki surowe i oczyszczone.

Najważniejszą moją uwagą dyskusyjną jest kwestia mechanizmu usuwania zarówno karbazolu, jak i karwedilolu z podłoża. Doktorantka oznaczała analitycznie karbazol i karwedilol w całej hodowli po dezintegracji biomasy. Jest to bardzo słuszne podejście, gdyż w ten sposób można znaleźć nieuwalniane do podłoża metabolity pośrednie przemian badanych związków chemicznych. Nasuwa się jednak pytanie o skład fazy ciekłej, przede wszystkim o stężenie karbazolu czy karwedilolu po odfiltrowaniu biomasy. Czy karbazol i karwedilol były wykrywalne na jakichś poziomach w przefiltrowanej brzeczce w każdej

godzinie hodowli? To pozwalałoby stwierdzić, czy i jak szybko badane związki chemiczne są od razu adsorbowane (prawdopodobny mechanizm biosorpcji) na żywej biomasie, po której to sorpcji z pewnością następuje biotransformacja związku chemicznego (to zostało niewątpliwie udowodnione przez Doktorantkę). Szczerze mówiąc, to zanik badanego związku w przefiltrowanym podłożu jest tak naprawdę tym właściwym usunięciem badanego związku. Badając w ten sposób usunięcie obu badanych związków chemicznych, Doktorantka być może uzyskalaby jeszcze bardziej spektakularne wyniki niż ten maksymalny wynik około 90% biotransformowanego karbazolu czy karwedilolu. I druga sprawa, czy w takiej przefiltrowanej brzezce da się wykryć jakieś produkty biotransformacji (np. hydroksylowane pochodne). Takie produkty biotransformacji wydzielane poza komórki mogą zwiększać lub zmniejszać toksyczność przefiltrowanego podłoża.

W artykule P1 Doktorantka stwierdza, że zidentyfikowała 2-hydroksykarbazol oraz 3-hydroksykarbazol jako produkty biotransformacji karbazolu przez grzyby z rodzaju *Cunninghamella*. Czy Doktorantka próbowała oznaczyć ilościowo te związki? Wydaje się to możliwe, gdyż deklaruje w materiałach i metodach posiadanie jako czystej substancji chemicznej 2-hydroksykarbazolu. Jeśli takie dane istnieją, prosiłbym o przedstawienie ich na obronie.

Nie ulega wątpliwości, że biotransformacja karbazolu wymaga warunków tlenowych i dostępności tlenu cząsteczkowego. Stąd pojawia się moje kolejne pytanie do dyskusji na temat morfologii grzybni. Zależnie od tego, czy jest to grzybnia rozproszona (wolne strzępki) czy zwarta (peletki) można się spodziewać innych poziomów biotransformacji ze względu na efektywność transportu tlenu do żywych komórek poprzez konwekcję (mieszanie zawiesiny) i dyfuzję na poziomie molekularnym do aglomeratów grzybni (peletki). Proszę zatem o krótką informację na temat uzyskanych form morfologicznych grzybni.

Podsumowanie i ostateczne wnioski

Przedstawione powyżej uwagi o charakterze dyskusyjnym nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę niniejszej rozprawy doktorskiej. Chciałbym tu jeszcze dodać, że dodatkowy dorobek Doktorantki poza cyklem publikacji jest naprawdę imponujący. W mojej opinii całokształt dorobku (liczba publikacji, cytowania) znacząco przekracza wymagania stawiane pracom doktorskim.

Zatem, ostatecznie stwierdzam, że w mojej ocenie rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Zawadzkiej 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 Naukowej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Katarzyny Zawadzkiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z całym przekonaniem składam wniosek o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej biorąc pod uwagę:

- bardzo wysoką jakość prowadzonych badań i sposób ich przedstawienia,
- formę przedstawionej rozprawy doktorskiej (4 publikacje w bardzo dobrych czasopismach z *Impact Factor*),
- bardzo bogaty dodatkowy dorobek naukowy Doktorantki (9 publikacji również w czasopismach z *Impact Factor*) oraz
- wyjątkowo wysoki, jak na osobę zaczynającą karierę naukową, indeks Hirscha na poziomie 6.

Małgorzata Kozłowska