

V. STRESZCZENIE

Butylowe związki cyny charakteryzują się różnorodnymi mechanizmami toksyczności, a ze względu na ich zdolność do akumulacji, pozostają długoterminowymi zanieczyszczeniami środowiska naturalnego. Niestety, substancje te stanowią zagrożenie nie tylko dla mikroorganizmów środowiskowych, organizmów morskich, ale także dla człowieka, będącego ostatnim ogniwem łańcucha pokarmowego. Konwencjonalne metody oczyszczania skażonych środowisk obarczone są wysokimi kosztami oraz stosunkowo niską skutecznością, przez co procesy biotechnologiczne wykorzystujące mikroorganizmy degradujące ksenobiotyki zyskały na wartości.

Niniejsza praca doktorska dotyczy oddziaływania wybranych substancji o właściwościach antyoksydacyjnych: witamin C i E oraz estrogenów naturalnych - 17 β -estradiolu i estronu na proces biodegradacji butylowych związków cyny, z jednoczesnym uwzględnieniem modyfikacji wybranych elementów lipidomu mikroskopowego grzyba strzępkowego *Metarhizium robertsii*.

W trakcie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej przeprowadzono optymalizację biodegradacji dibutylocyny (DBT) przez szczep grzybowy *M. robertsii* IM 6519, doprowadzając do szybkiej i całkowitej eliminacji badanego związku ze środowiska wzrostu. Następnie, odkryto procesy leżące u podstaw efektywnego rozkładu butylowych związków cyny, takie jak zmiany morfologiczne grzybni indukowane intensywnym napowietrzaniem, kometabolizm oraz udział monooksygenaz cytochromu P450 w tym procesie. Z kolei identyfikacja hydroksylowanej monobutylocyny (MBTOH), jako metabolitu pośredniego powstającego w trakcie reakcji debutylicacji DBT, umożliwiła zaproponowanie szlaku biotransformacji związku macierzystego. Kolejny cel naukowy niniejszej pracy dotyczył wpływu kilku substancji o właściwościach antyoksydacyjnych na wydajność rozkładu butylowych związków cyny przez badany grzyb strzępkowy. W rezultacie przeprowadzonych analiz wskazano na witaminę C jako najlepszy suplement hodowli szczepu *M. robertsii* IM 6519 wyjaśniając pozytywne oddziaływanie przeciwutleniacza poprzez ograniczenie peroksydacji błon komórkowych. Negatywny wpływ estrogenów naturalnych na wydajność biodegradacji DBT został natomiast wyjaśniony występowaniem zjawiska inhibicji kompetycyjnej monooksygenaz cytochromu P450. Detekcja *in situ* reaktywnych form tlenu i azotu w badanej grzybni dostarczyła dowodów, iż przyczyną ich nadprodukcji jest obecność MBT (substancji uznawanej za najmniej toksyczną spośród butylowych związków cyny), a nie

DBT (jak początkowo uważano). Z kolei, wykluczenie udziału enzymów antyoksydacyjnych takich jak katalaza i dysmutaza ponadtlenkowa w usuwaniu nadtlenu wodoru i anionorodnika ponadtlenkowego potwierdziło pośrednio efektywność estronu i 17 β -estradiolu w usuwaniu reaktywnych form tlenu. Podczas realizacji ostatniego celu naukowego niniejszej pracy doktorskiej zidentyfikowano zmiany adaptacyjne wybranych komponentów i właściwości fizyko-chemicznych błon grzybowych *M. robertsii* stanowiących swoiste biomarkery obecności DBT/TBT i witaminy C. Wśród wyznaczników uniwersalnej reakcji komórek poddanych ekspozycji na badane związki wyróżniono stosunek fosfatydylocholin do fosfatydyloetanolamin, stosunek zawartości 16- do 18-węglowych kwasów tłuszczowych, poziom PC 18:2 18:2, wartość indeksu wiązań podwójnych, poziom ergosterolu oraz zwiększoną sztywność i integralność błon komórkowych.

Analizy przeprowadzone w trakcie tworzenia niniejszej rozprawy doktorskiej umożliwiły stworzenie nieopisanego wcześniej systemu biologicznego służącego do szybkiej i całkowitej eliminacji butylowych związków cyny z użyciem szczepu grzybowego *M. robertsii* IM 6519 inkubowanego w warunkach intensywnego napowietrzania oraz suplementacji podłoża wzrostowego witaminą C.

Badania wykonane podczas realizacji niniejszej pracy doktorskiej mają charakter podstawowy, jednakże zauważalny jest potencjał przeniesienia opracowanego modelu biologicznego z warunków laboratoryjnych na ewentualne aplikacje praktyczne w obszarze utylizacji osadów ściekowych stanowiących rezerwuar butylowych związków cyny. Co więcej, uzyskane wyniki mogą posłużyć podczas kreowania innych systemów biologicznych do usuwania związków o podobnym, szkodliwym działaniu.

Stolank Paulina

VI. ABSTRACT

Butyltin compounds are characterized by a variety of toxicity mechanisms. Moreover, due to their ability to accumulate, they remain long-term pollutants of the natural environment. Unfortunately, these substances pose a threat not only to environmental microorganisms and marine organisms but also to humans, who are the last link in the food chain. Conventional purification methods of contaminated environments are burdened with high costs and relatively low efficiency, therefore biotechnological processes using xenobiotic-degrading microorganisms have gained in value.

This doctoral thesis concerns the analysis of the effect of the compounds with antioxidant properties: vitamins C and E, natural estrogens - 17β -estradiol and estrone on the process of butyltins biodegradation with simultaneous consideration of the modification of selected elements of the lipidome of the microscopic filamentous fungus *Metarhizium robertsii*.

During the doctoral thesis realization, optimization of dibutyltin (DBT) biodegradation by a fungal strain *M. robertsii* IM 6519 was carried out, leading to rapid and complete elimination of the compound from the growth environment. Subsequently, the processes underlying the effective decomposition of butyltin compounds, such as morphological mycelium modifications induced by intensive aeration, cometabolism and participation of cytochrome P450 monooxygenases, were discovered. Moreover, identification of the hydroxylated monobutyltin (MBTOH), as an intermediate metabolite formed during the DBT debutilation made it possible to propose a biotransformation pathway of the parent compound. The subsequent aim of the doctoral thesis concerned an impact of few compounds with antioxidant properties on the efficiency of butyltins decomposition by the tested filamentous fungus. As a result of the performed analyses, vitamin C was indicated as the best culture supplement for the *M. robertsii* IM 6519 strain explaining the positive effect of the antioxidant by limiting the cell membranes peroxidation. On the other hand, a negative effect of the natural estrogens on the efficiency of DBT biodegradation was explained by the occurrence of the competitive inhibition of cytochrome P450 monooxygenases. *In situ* detection of reactive oxygen and nitrogen species in the tested mycelium providing evidence that their overproduction is caused by the presence of MBT (a substance considered as the least toxic among butyltin compounds) and not DBT (as initially thought). In turn, the exclusion of participation of antioxidative enzymes such as catalase and superoxide dismutase in the removal of hydrogen peroxide and superoxide anion indirectly proved the effectiveness of

estrone and 17 β -estradiol in removal of reactive oxygen species. During realization of the last aim of the doctoral thesis, adaptive modifications of chosen components and physico-chemical properties of the *M. robertsii* membranes were identified and some of them were indicated as specific biomarkers of the presence of DBT/TBT and vitamin C. A ratio of phosphatidylcholines to phosphatidylethanolamines, ratio of 16- to 18-carbon fatty acids, PC 18:2 18:2 content, double bonds index, ergosterol level and increased stiffness and integrity of the cell membranes were indicated as determinants of the universal response of the fungal cells exposed to the tested compounds.

The analyses conducted during the creation of the doctoral thesis made it possible to create a previously unwritten biological system for the rapid and complete elimination of butyltin compounds by the application of a fungal *M. robertsii* IM 6519 strain incubated under conditions of intense aeration and vitamin C supplementation.

The research carried out during the realization of the doctoral thesis is basic, but a potential of transferring of the developed biological model from laboratory conditions to possible practical applications (i.e. for the utilization of sewage sludge constituting a reservoir of butyltin compounds) is visible. Moreover, the obtained results can be used for creating other biological systems to remove compounds with similar harmful effects.

Stolank Paulina