

Streszczenie

Organiczne związki cyny ze względu na pełnienie funkcji stabilizatorów polichloru poliwynylu (PCW) oraz wysoką skuteczność biobójczą znalazły szerokie zastosowanie w przemyśle i rolnictwie. Wprowadzone do środowiska wywołują wiele niekorzystnych zmian w organizmach. Spośród nich, szczególnie wysoką toksycznością charakteryzuje się tributyllocyna. Proces mikrobiologicznego rozkładu TBT jest dotychczas słabo poznany, chociaż stanowi jedno z głównych źródeł eliminacji tego związku ze środowiska. W prezentowanej pracy oceniono zdolność do degradacji TBT przez grzyb strzępkowy *Cunninghamella echinulata* IM 2611. Określono ponadto wpływ TBT na morfologię i aktywność metaboliczną grzybni, a także zbadano jakie zmiany zachodzą w profilu metabolomicznym i białkowym w wyniku ekspozycji drobnoustroju na badany ksenobiotyk. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem szeregu technik analitycznych, opartych przede wszystkim o spektrometrię mas (GC-MS, LC-MS/MS i MALDI-TOF/TOF) i techniki elektromigracyjne (1- i 2-DE). Uzyskane dane analizowano z wykorzystaniem specjalistycznego oprogramowania komputerowego. Przeprowadzone badania wykazały, że grzyb *C. echinulata* IM 2611 był zdolny do eliminacji ponad 90% ksenobiotyku w ciągu 120 godzin hodowli przy stężeniu wyjściowym wynoszącym 5 mg/l. Jednocześnie stwierdzono, że TBT ulega przekształceniu do dibutyllocyny (DBT), monobutyllocyny (MBT) oraz hydroksylowanej pochodnej TBT. Wstępne analizy uwidoczniły zmiany w profilu aminokwasów oraz białek badanego mikroorganizmu i stanowiły punkt wyjścia do rozszerzenia badań nad nimi w dalszych częściach pracy. Wykazano, że obecność ksenobiotyku w hodowli niekorzystnie wpływała na drobnoustrój, co przejawiało się silnym zahamowaniem przyrostu biomasy, połączonym ze spadkiem aktywności metabolicznej grzybni oraz zmniejszonym wykorzystaniem glukozy i wybranych aminokwasów z podłoża hodowlanego. Na podstawie analizy mikroskopowej stwierdzono plazmolizę i wakuolizację cytoplazmy. Wymienionym wyżej zjawiskom towarzyszyły również zmiany w profilu metabolomicznym drobnoustroju. Odnotowano wzrost stężenia metabolitów glikolizy przy jednoczesnym spadku zawartości związków cyklu Krebsa. Pod wpływem TBT, grzyb strzępkowy zwiększał produkcję związków o właściwościach antyoksydacyjnych (betaina, prolina, kwas γ -aminomasłowy).

Uzyskane wyniki sugerujące zachodzenie istotnych zmian w profilu białkowym grzyba w obecności ksenobiotyku wskazały na konieczność wykonania pogłębionych badań proteomicznych podczas biodegradacji TBT. Przeprowadzona analiza proteomu wykazała

indukcję procesów biochemicznych ukierunkowanych na zwiększenie syntezy ATP. Zaobserwowano również nadprodukcję białek i enzymów zaangażowanych w ochronę komórki przed stresem oksydacyjnym, której towarzyszyła zwiększona produkcja reaktywnych form tlenu (RFT) oraz wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Odnotowano także wzmożoną biosyntezę prohibityny, białka odgrywającego istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu mitochondriów. Z kolei nadprodukcja nukleazy C1 może być związana z ochroną DNA przed uszkodzeniami.

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji niniejszej pracy doktorskiej przyczyniły się do wyodrębnienia szczepu grzybowego zdolnego do wydajnej biotransformacji TBT. Przeprowadzone badania wykazały niekorzystny wpływ ksenobiotyku na grzybnię *C. echinulata* IM 2611, wskazując jednocześnie mechanizmy odpowiedzialne za oporność drobnoustroju na wysokie stężenie ksenobiotyku przy jednoczesnej wydajnej eliminacji tego związku ze środowiska wzrostu. Zastosowanie zaawansowanych, nowoczesnych technik analitycznych pozwoliło zidentyfikować mechanizmy komórkowe zaangażowane w przeciwdziałanie niekorzystnym zmianom wywołanym obecnością ksenobiotyku w środowisku wzrostu grzyba. Analizy zmian metabolomu i proteomu grzyba poddanego ekspozycji na TBT miały charakter nowatorski i nie były dotychczas przedmiotem badań.

Adriana Sobocińska

Abstract

Due to their role as polyvinyl chloride (PVC) stabilizers and high biocidal effectiveness, organic tin compounds have found wide applications in industry and agriculture. When they are introduced into the environment, they cause many adverse changes in organisms. Among these harmful substances, tributyltin is characterized by particularly high toxicity. The process of microbial degradation of TBT is still poorly understood, although it is one of the main methods of eliminating this compound from the environment. In the presented work, the ability of the filamentous fungus *Cunninghamella echinulata* IM 2611 to degrade TBT was assessed. The effect of TBT on the morphology and metabolic activity of the mycelium was determined. Also, changes in the metabolomic and protein profile as a result of exposure of the microorganism to the xenobiotic were examined. The research was carried out using a number of analytical techniques, primarily based on mass spectrometry (GC-MS, LC-MS/MS and MALDI-TOF/TOF) as well as electromigration techniques (1- and 2-DE). The obtained data were analyzed using specialized computer software. The study showed that the fungus *C. echinulata* IM 2611 was able to eliminate over 90% of the xenobiotic at the initial concentration of 5 m/l during 120 hours of cultivation. At the same time, TBT was found to be converted to dibutyltin (DBT), monobutyltin (MBT) and a hydroxylated TBT derivative. Initial analyses revealed changes in the profile of amino acids and proteins of the studied microorganism and became the starting point for extending the research in further parts of the work. It was shown that the presence of the xenobiotic in the culture adversely affected the microorganism, which was manifested by a strong inhibition of biomass growth, combined with a decrease in the metabolic activity of mycelium and reduced use of glucose and selected amino acids from the culture medium. During the microscopic analysis, plasmolysis and vacuolization of the cytoplasm were observed. These phenomena were accompanied by changes in the metabolomic profile of the microorganism. An increase in the concentration of glycolysis metabolites with a simultaneous decrease in the content of Krebs cycle compounds was noted. Under the influence of TBT, the filamentous fungus increased the production of compounds with antioxidant properties (betaine, proline, γ -aminobutyric acid).

The obtained results, which revealed significant changes in the protein profile of the fungus in the presence of TBT, indicated the need for in-depth proteomic studies during its biodegradation. The performed proteome analysis showed that in response to a decrease in the ATP concentration in fungal cells, resulting from the inhibitory effect of TBT on ATP synthase, the microorganism induced biochemical processes aimed at increasing ATP

synthesis. Overproduction of proteins and enzymes involved in cell protection against oxidative stress was also observed, which was correlated with an intensified generation of reactive oxygen species (RFT) and an increase in superoxide dismutase (SOD) activity. Increased biosynthesis of prohibitin, a protein that plays an important role in the proper functioning of mitochondria, was also noted. Overproduction of C1 nuclease might have been associated with DNA protection against damage.

The results obtained during the implementation of this dissertation contributed to the isolation of a fungal strain capable of efficient TBT biotransformation. The metabolomic and proteomic analyses of the microorganism exposed to TBT were innovative and had not been performed before. The conducted experiments showed the adverse effect of the xenobiotic on the mycelium of *C. echinulata* IM 2611, at the same time indicating the mechanisms responsible for the resistance of the microorganism to the high concentration of the xenobiotic with its simultaneous effective elimination from the growth environment. The use of advanced, modern analytical techniques allowed identifying cellular mechanisms involved in counteracting adverse changes caused by the presence of xenobiotics in the fungal growth environment.

Adrian Sobal