

AUTOREFERAT

Dr Sylwia Różalska

Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii

Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Uniwersytet Łódzki

1. Imię i nazwisko: Sylwia Różalska**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:**

19 czerwca 1997 r. – tytuł magistra biologii, w zakresie mikrobiologii, Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Ochrony Środowiska), tytuł pracy: „Mikrobiologiczna degradacja związków ropopochodnych w obecności metali ciężkich”. Promotor: prof. dr hab. Jerzy Długoński.

16 grudnia 2003 r. – stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii nadany uchwałą Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego; tytuł rozprawy doktorskiej „Drożdże rozszczepkowe *Schizosaccharomyces pombe* jako model w badaniu detoksykacji androgenów” Promotor: prof. dr hab. Jerzy Długoński.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

01. 10. 1997 r. – 31. 01. 2004 – asystent w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

01.02.2004 r. – do chwili obecnej – adiunkt w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego

4. Osiągnięcie naukowe wynikające z art.16, ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. Nr 65, poz. 595 ze zm.):

A) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Osiągnięciem jest cykl 5 publikacji naukowych zatytułowany: „Wykorzystanie grzybów entomopatogennych z rodzaju *Metarhizium* do degradacji ksenoestrogenów”

B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Różalska S.**, Pawłowska J., Wrzosek M., Tkaczuk C., Długoński J. (2013). Utilization of 4-*n*-nonylphenol by *Metarhizium* sp. isolates. *Acta Biochimica Polonica*, 60(4): 677-682.

MNiSW₂₀₁₃ = 15, IF₂₀₁₃ = 1,389 (Indeks cytowań WoS 7)

Wkład habilitantki 60%, opracowanie koncepcji pracy, przygotowanie planu eksperymentów, udział w wykonaniu eksperymentów, opracowanie i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu.

2. **Różalska S.**, Glińska S., Długoński J. (2014). *Metarhizium robertsii* morphological flexibility during nonylphenol removal. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 95: 285-293.

MNiSW₂₀₁₄ = 30, IF₂₀₁₄ = 2,131 (Indeks cytowań WoS 4)

Wkład habilitantki 75%, opracowanie koncepcji pracy, zaprojektowanie i wykonanie większości pracy eksperymentalnej, opracowanie i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu.

3. **Różalska S.**, Soboń A., Pawłowska J., Wrzosek M., Długoński J. (2015). Biodegradation of nonylphenol by a novel entomopathogenic *Metarhizium robertsii* strain. *Bioresource Technology*. 191: 166-172.

MNiSW₂₀₁₅ = 45, IF₂₀₁₄ = 4,494 (Indeks cytowań WoS 4)

Wkład habilitantki 60%, opracowanie koncepcji pracy, zaprojektowanie i wykonanie większości pracy eksperymentalnej, opracowanie i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu.

4. Różalska S., Bernat P., Michnicki P., Długoński J. (2015). Fungal transformation of 17α -ethinylestradiol in the presence of various concentrations of sodium chloride. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 103: 77-84.

MNiSW₂₀₁₅ = 30, IF₂₀₁₄ = 2,131 (Indeks cytowań WoS 1)

Wkład habilitantki 65%, opracowanie koncepcji pracy, wiodący udział w wykonaniu pracy eksperymentalnej, opracowanie i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu.

5. Różalska S., Soliwoda K., Długoński J. (2016). Synthesis of silver nanoparticles from *Metarhizium robertsii* waste biomass extract after nonylphenol degradation and their antimicrobial and catalytic potential. *RSC Advances*. 6: 21475-21485.

MNiSW₂₀₁₅ = 35, IF₂₀₁₄ = 3,840 (Indeks cytowań WoS 0)

Wkład habilitantki 75%, opracowanie koncepcji pracy, zaprojektowanie pracy eksperymentalnej, wykonanie większości pracy eksperymentalnej, opracowanie i interpretacja wyników oraz przygotowanie manuskryptu.

Sumaryczny IF publikacji wchodzących w skład osiągnięcia = 13,985

Łączna liczba punktów MNiSW =155

IF i punkty MNiSW podano według danych z roku publikacji. Dla publikacji z lat 2015-2016 IF podano z 2014 r., natomiast punkty MNiSW za 2015 r.

C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Cytowania prac naukowych, stanowiących osiągnięcie podane są wg numeracji publikacji zastosowanej w pkt. 4B niniejszego załącznika. Pozostałe cytowania umieszczono w przypisach.

WPROWADZENIE

Związki zaburzające gospodarkę hormonalną organizmu (ang. Endocrine Disrupting Compounds, EDCs) są to substancje naturalne lub syntetyczne, które dzięki strukturalnemu podobieństwu oraz zdolności wiązania się z receptorami hormonalnymi w komórce, mogą zaburzać funkcjonowanie układu endokrynnego u ludzi i zwierząt¹. Lista związków zaliczanych do EDCs każdego roku powiększa się i znajdują się na niej różnorodne substancje chemiczne m.in. pestycydy, środki farmaceutyczne oraz związki chemiczne powszechnie stosowane w przemyśle. Szczególnie niebezpieczną grupę EDCs stanowią ksenoestrogeny, czyli substancje obce wykazujące aktywność estrogeną. Do grupy tej zaliczamy między innymi alkilofenole (np. nonylofenol, oktylofenol) oraz syntetyczne estrogeny (np. 17 α -etynyloestradiol - EE2). Alkilofenole są wykorzystywane na masową skalę przy produkcji detergentów używanych m.in. w gospodarstwach domowych, natomiast EE2 jest powszechnie stosowany jako składnik doustnych środków antykoncepcyjnych, a także środków używanych w hormonalnej terapii zastępczej podczas menopauzy. Związki te przedostają się do środowiska wraz ze ściekami komunalnymi, gdzie stwarzają istotne zagrożenie dla zdrowia i życia wielu organizmów ze względu na swoją toksyczność oraz właściwości endokrynne². W ostatnich latach, wraz z rozwojem technik analitycznych, wzrosło wykrywanie tych substancji w środowisku naturalnym, natomiast czynniki i mechanizmy regulujące przebieg rozkładu tych związków z udziałem drobnoustrojów w dalszym ciągu są

¹ Singleton D., Khan S. (2003). Xenoestrogen exposure and mechanisms of endocrine disruption. *Front Biosci.* 8: 110-8.

² Paterakis N., Chiu T., Koh Y., Lester J., McAdam E., Scrimshaw M., Soares A., Cartmell E. (2012). The effectiveness of anaerobic digestion in removing estrogens and nonylphenol ethoxylates. *J Hazard Mater.*;199-200:88-95.

stosunkowo słabo poznane³. Ksenobiotyki te charakteryzują się dość wysoką opornością na procesy degradacyjne, która często wzrasta w obecności innych zanieczyszczeń zarówno organicznych, jak i nieorganicznych np. chlorku sodu⁴.

Chociaż do niedawna uważano, że ksenoestrogeny to związki zanieczyszczające głównie wody powierzchniowe, wykazano także ich występowanie w glebach, do których przedostają się między innymi podczas nawożenia osadami ściekowymi⁵. EDCs wprowadzane do gleby mogą być eliminowane przez obecne tam mikroorganizmy. Liczne gatunki drobnoustrojów glebowych, w tym grzybów, mogą transformować lub degradować toksyczne zanieczyszczenia, co może być wyrazem ich strategii adaptacyjnej do zmieniających się warunków środowiskowych⁶.

Grzybami strzępkowymi powszechnie obecnymi w glebach są entomopatogeny zaliczane do rodzaju *Metarhizium*. Odgrywają one istotną rolę w naturalnych ekosystemach jako czynniki kontrolujące populacje stawonogów. Szacuje się, że liczba zarodników *Metarhizium* sp. może wynosić nawet 1×10^6 w 1 gramie gleby⁷. Mimo, że stosunkowo dobrze poznano właściwości chorobotwórcze tych grzybów oraz mechanizmy regulujące przebieg patogenezy u owadów, istnieją tylko nieliczne doniesienia w literaturze naukowej dotyczące wpływu toksycznych zanieczyszczeń obecnych w glebie (w tym ksenobiotyków) na grzyby entomopatogenne. Ograniczone są także dane dotyczące zdolności adaptacyjnych tej grupy drobnoustrojów do niekorzystnych warunków środowiskowych.

CEL NAUKOWY I ZNACZENIE PROWADZONYCH BADAŃ

Pomimo wprowadzenia ograniczeń w stosowaniu i produkcji nonylofenoli⁸, jak również zwiększenia się świadomości społeczeństwa dotyczącej niekorzystnych skutków stosowania EE2, ich ilość w środowisku stale utrzymuje się na wysokim

³ Krupiński M., Długoński J. (2011). Biodegradacja nonylofenoli przez wybrane drobnoustroje. *Postępy Mikrobiologii*. 50: 313-319.

⁴ Robinson B., Hellou J. (2009). Biodegradation of endocrine disrupting compounds in harbour seawater and sediments. *Sci. Total Environ.* 407: 5713-5718.

⁵ Brown S., Devin-Clarke D., Doubrava M., O'Conno G. (2009). Fate of 4-nonylphenol in a biosolids amended soil. *Chemosphere* 75, 549-554.

⁶ Jeon C., Madsen E. (2012). In situ microbial metabolism of aromatic hydrocarbon environmental pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24: 1–8.

⁷ Milner R. (1992). Selection and characterization of strains of *Metarhizium anisopliae* for control of soil insects in Australia. In: *Biological Control of Locusts and Grasshoppers*. Lomer C.J., Prior C eds, pp 200–207. CAB International, Wallingford.

⁸ Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for the Community action in the field of water policy.

poziomie. W związku z tym, niezwykle ważne jest zbadanie możliwości usuwania ksenoestrogenów przez szczepy drobnoustrojów izolowane ze środowiska. Badania zawarte w prezentowanym osiągnięciu miały na celu wyjaśnienie czy grzyby entomopatogenne z rodzaju *Metarhizium* są zdolne do eliminacji EDCs, czy i w jaki sposób, przebiega proces degradacji oraz czy ksenoestrogeny wywierają niekorzystny wpływ na te drobnoustroje. Dodatkowo, zaproponowałam nowatorski sposób wykorzystania grzybni odpadowej pozostałej po zakończonym procesie biodegradacji do produkcji nanocząstek.

Dzięki nawiązanej współpracy z Zakładem Filogenetyki Molekularnej i Ewolucji Uniwersytetu Warszawskiego, jak również z Zakładem Ochrony i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach, udało mi się zgromadzić osiem szczepów grzybów strzępkowych, które na podstawie wstępnej charakterystyki morfologicznej zaklasyfikowano do rodzaju *Metarhizium* [1]. Dzięki przeprowadzonej identyfikacji molekularnej z zastosowaniem pięciu markerów genetycznych (ITS, TEF, MzIGS3, MzIGS5, MzFg543)⁹, uzyskano 37 nowych sekwencji (umieszczonych w GeneBank). Na podstawie analizy drzewa filogenetycznego wykazano, że sześć spośród pozyskanych szczepów należało do gatunku *M. robertsii*, a pozostałe dwa to szczepy *M. lepidiotae* oraz *M. brunneum*. W pracy potwierdzono również patogeniczność wszystkich wyizolowanych szczepów w stosunku do larw barciaka większego (*Galleria mellonella*).

W dalszych badaniach skoncentrowałam się na oznaczeniu zdolności degradacyjnych pozyskanych grzybów strzępkowych. W pracy zastosowałam nierozgałęziony izomer nonylofenolu (4-*n*-NP) dodawany w wyjściowej ilości 50 mg/l. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że wszystkie badane szczepy *Metarhizium* sp. były zdolne do usuwania ksenobiotyku ze środowiska wzrostu. Szczepy *M. robertsii*, charakteryzowały się bardzo wysoką wydajnością eliminacji tego toksycznego ksenobiotyku i po 24h inkubacji w ekstraktach pochodzących stwierdzono zaledwie od 6 do 24% substratu (w zależności od szczepu). Użyty do badań szczep, zidentyfikowany jako *M. brunneum*, charakteryzował się porównywalną zdolnością do usuwania nonylofenolu do *M. robertsii*, podczas gdy *M.*

⁹ Kepler R., Rehner S. (2013). Genome-assisted development of nuclear intergenic sequence markers for entomopathogenic fungi of the *Metarhizium anisopliae* species complex. Mol. Ecol. Resour. 13: 210–217.

lepidiotae był najmniej wydajny, aż około 40% substratu pozostawało w podłożu wzrostowym po zakończeniu inkubacji.

W celu wyjaśnienia, czy w badanych układach eliminacja 4-*n*-NP nie jest ograniczona jedynie do wiązania ksenobiotyku z grzybnią, przeprowadziłam derywatyzację BSFTA [N,O-bis-(trimetylosililo)trifluoroacetamid] i analizę techniką chromatografii gazowej sprzężonej z detekcją mas (GC-MS). Ponieważ większość metabolitów była produkowana w niewielkich ilościach skoncentrowałam się na trzech pochodnych: kwasie 4-hydroksyfenylopentanowym, kwasie 4-hydroksyfenylooctowym oraz kwasie 4-hydroksybenzoowym. Z danych literaturowych wynika, że pierwszy z metabolitów jest tworzony na początkowym etapie, drugi na środkowym, natomiast trzeci na ostatnim etapie degradacji (bezpośrednio przed rozerwaniem pierścienia aromatycznego). Uzyskane dane były zbieżne z otrzymanymi wynikami eliminacji nonylofenolu dla poszczególnych szczepów. Największa ilość kwasu 4-hydroksyfenylopentanowego została wykryta u *M. lepidiotae*, który nie tylko charakteryzował się najniższą zdolnością do degradacji ksenobiotyku spośród badanych szczepów, ale także najniższą patogennością w stosunku do larw owadów. Największa ilość kwasu 4-hydroksybenzoowego została stwierdzona w hodowlach *M. robertsii*, co wynika z zaobserwowanej wcześniej wydajnej degradacji badanego substratu - nonylofenolu. Potwierdzenie zdolności degradacyjnych wyizolowanych szczepów *Metarhizium* sp. pozwala przypuszczać, że drobnoustroje te mogą brać udział w usuwaniu ksenobiotyków w środowisku naturalnym.

Badania przeprowadzone w pracy [1] jednoznacznie wykazały, że Metarhizium sp., są zdolne do biodegradacji nonylofenolu. Zaobserwowana dynamika usuwania tego ksenobiotyku stanowiła także przesłankę do wykorzystania tych szczepów grzybowych jako modelu badawczego w badaniach degradacji nonylofenolu. Jednak niezbędne jest oznaczenie wpływu wysokich stężeń tego EDCs na Metarhizium sp. jak również określenie mechanizmów warunkujących przeżywanie tych grzybów w wysokich stężeniach tego związku.

Mając na uwadze powyższe spostrzeżenia, w kolejnej pracy zbadalam wpływ nonylofenoli na morfologię *M. robertsii* (szczep IM6511) [2]. Dane literaturowe wskazują, że nonylofenol jest związkiem silnie toksycznym w stosunku do

organizmów żywych¹⁰. W badaniach zastosowałam zarówno pojedynczy izomer 4-*n*-NP, jak i techniczny nonylofenol (stanowiący mieszaninę kilkudziesięciu izomerów). Wstępne badania wykazały, że *M. robertsii* jest zdolny do wzrostu w obecności nonylofenoli aż do stężenia 100 mg/l, jednak wysoka zawartość substratu w hodowli sprzyjała spowolnieniu przyrostu biomasy w stosunku do układów bez dodatku ksenobiotyku. Analiza ilościowa wykonana techniką chromatografii gazowej sprzężonej z detekcją mas wykazała, że badane izomery nonylofenolu były eliminowane ze środowiska wzrostu już od pierwszej doby inkubacji (z różną wydajnością, zależną od rodzaju i ilości początkowej substratu) i usuwane w czasie 7 dni.

Korzystając z oprogramowania AxioVision (Zeiss) oraz Mikroskopu Axiovert 200M (Zeiss) opracowałam metodę automatycznej analizy obrazu umożliwiającą nie tylko oznaczenie rodzaju form morfologicznych (peletek lub zbitych strzępek), ale także pomiary wielkości czy kolistości peletek oraz automatyczne wyodrębnienie części zbitej peletki (tzw. jądra peletki). Zarówno wielkość, jaki i stosunek pola powierzchni jądra do całej powierzchni rzutu peletki, są ważnymi parametrami morfologicznymi grzybów (stopień upakowania peletek, ich struktura, właściwości powierzchniowe), które mogą wpływać na szybkość i wydajność procesu degradacji. Przeprowadzone przeze mnie analizy udowodniły, że grzyb ten w obecności ksenobiotyków rośnie w formie małych, zwartych, gęsto upakowanych peletek, które dominowały w czasie intensywnego usuwania substratu z hodowli. Podczas degradacji, zmiany te stopniowo zanikały, a po usunięciu nonylofenolu z hodowli, peletki nie różniły się istotnie od kontrolnych. Równie ważnym osiągnięciem było wykazanie, że obserwacje morfologii peletek pozwalają monitorować przebieg procesu utylizacji nonylofenoli.

Prowadząc badania morfologii peletek, zainteresowałam się też stanem fizjologicznym komórek, jak również ewentualnymi zmianami w zachodzących w morfologii strzępek. W tym celu opracowałam metodę oznaczania żywotności grzybni *M. robertsii* przy użyciu diocjanu fluoresceiny i czytnika fluorescencyjnego. Wykazałam, że w przypadku prób z dodatkiem nonylofenoli, aktywność metaboliczna peletek jest skorelowana z wynikami ich pomiarów morfologicznych. Otrzymany

¹⁰ Soares A., Guieysse B., Jefferson B., Cartmell E. & Lester J. N. (2008). Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environ. Int.* 34: 1033-1049.

wynik zainspirował mnie do określenia zmian adaptacyjnych w morfologii wewnątrzkomórkowej *M. robertsii*. Dzięki nawiązanej współpracy z Laboratorium Mikroskopii Elektronowej UŁ wykonałam badania ultrastruktury strzępek *M. robertsii*, a do najbardziej istotnych, zaobserwowanych zmian, zaliczam występowanie mitochondriów o odmiennej morfologii i zmian w strukturze ściany komórkowej. Stwierdziłam, że zaobserwowane zgrubienie i rozwarstwienie ściany komórkowej *M. robertsii*, inkubowanych w obecności nonylofenolu, jest związane z odpowiedzią grzyba na niekorzystne warunki środowiskowe. Aby dokładnie określić charakter tych zmian, przeprowadziłam oznaczenia ilościowe składu ściany komórkowej, β -glukanów i chityny, korzystając między innymi z techniki tandemowej spektrometrii mas sprzężonej z chromatografią cieczową (LC-MS/MS). Wykazałam, że obserwowanym zmianom w grubości ściany komórkowej towarzyszą także zmiany w proporcji β -glukanów do chityny, a także zmniejszenie ilości tych komponentów w próbach, w których wykazano rozwarstwienie ściany. Badania te rozszerzyłam o oznaczenia obecności nonylofenoli w ścianie komórkowej techniką chromatografii gazowej sprzężonej z detekcją mas (GC-MS). Umożliwiło mi to stwierdzenie obecności ksenobiotyku w ścianie komórkowej *M. robertsii*, który występował w dużej ilości w próbach, w których obserwowano rozwarstwienie ściany komórkowej.

*Wyniki przedstawione w tej pracy pozwoliły mi stwierdzić, że zaobserwowane zmiany w morfologii peletek (inkubowanych w obecności badanych ksenobiotyków) są powiązane z ich obniżoną aktywnością metaboliczną, jak również są wynikiem zmian w ultrastrukturze strzępek i składzie ściany komórkowej. Obserwacje mikroskopowe i pomiary wielkości peletek *M. robertsii* pozwalają monitorować przebieg procesu degradacji. Jednak, aby móc w pełni kontrolować ten proces niezbędne jest opisanie szlaku degradacji.*

W związku z tym, w kolejnej pracy przeprowadziłam badania zmierzające do oznaczenia pochodnych rozkładu 4-*n*-NP powstających w czasie degradacji przez *M. robertsii* [3]. W pracy zastosowałam nowo wyizolowany szczep *M. robertsii* IM6519, który wykazywał zdolność do wzrostu w obecności 4-*n*-NP w stężeniu 10, 20 i 40 mg/l, a wyznaczony, na podstawie otrzymanych wyników, specyficzny współczynnik wzrostu μ nie różnił się znacząco pomiędzy badanymi próbkami z dodatkiem ksenobiotyku a próbą biotyczną (bez dodatku nonylofenolu). Obserwacja ta skłoniła mnie do sprawdzenia zdolności *M. robertsii* IM6519 do usuwania tego EDCs. Analizy

ilościowe wykonane techniką GC-MS wykazały, że szczep ten usuwał, już w czasie pierwszej doby inkubacji, 95% 4-*n*-NP dodanego w stężeniu początkowym 10 i 20 mg/l oraz 85% tego związku dodanego w stężeniu początkowym 40 mg/l. Po 48h inkubacji stwierdzono obecność jedynie śladowych ilości 4-*n*-NP we wszystkich próbach pochodowlanych.

Równolegle wykonałam analizę jakościową, zmierzającą do oznaczenia pochodnych rozkładu badanego ksenobiotyku, wykorzystując opisaną przeze mnie we wcześniejszej pracy [1] metodę derywatywacji chemicznej oraz technikę GC-MS. Dzięki przeprowadzonej analizie otrzymanych widm masowych, możliwe było wykazanie aż 34 produktów degradacji 4-*n*-NP. Jak do tej pory, zidentyfikowano zaledwie kilka- kilkanaście pochodnych i na ich podstawie tworzono szlaki degradacji¹¹. Niektóre z oznaczonych w pracy [3] metabolitów nie były do tej pory opisywane jako produkty degradacji nonylofenolu w hodowlach grzybowych.

Ponieważ zarówno liczba prób, jak i liczba zidentyfikowanych przeze mnie pochodnych była znaczna, w celu poprawnej interpretacji wyników, zastosowałam analizę głównych składowych (PCA, *ang.* Principal Component Analysis). Dzięki tej metodzie, wykazałam występowanie różnic pomiędzy próbami badanymi (z dodatkiem 4-*n*-NP) oraz kontrolami biotycznymi (bez dodatku toksycznego substratu) w początkowych godzinach inkubacji, a także zaobserwowałam, że w 72 godzinie inkubacji próby z dodatkiem 4-*n*-NP charakteryzowały się dużym podobieństwem do kontrolnych, co sugerowało zakończenie procesu degradacji.

Przeprowadzona analiza PCA pozwalała ponadto przypuszczać, że niektóre ze zidentyfikowanych metabolitów obecne są nie tylko w próbach badanych, ale także w układach kontrolnych. W celu potwierdzenia czy związki te są produktami degradacji, czy też naturalnie występują w komórkach *M. robertsii*, wykonałam dalsze, bardziej szczegółowe analizy, dzięki którym stwierdziłam że cztery związki - 4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd, 4-hydroksy-3-metoksyacetofenon, kwas 4-hydroksy-3-metoksybenzoesowy oraz kwas 4-hydroksy-3-metoksy fenylooctowy nie mogą być rozpatrywane jako produkty degradacji nonylofenolu, gdyż występują w komórkach *M. robertsii* w sposób naturalny.

¹¹ Vallini G., Frassinetti S., D'Andrea F., Catelani G., Agnolucci M. (2001). Biodegradation of 4-(1-nonyl)phenol by axenic cultures of the yeast *Candida aquatextoris*: identification of microbial breakdown products and proposal of a possible metabolic pathway. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 47: 133–134.

Wykonane analizy trendu oraz PCA pojawiania się pochodnych 4-*n*-NP, umożliwiły mi opracowanie szlaku degradacji badanego EDCs przez *M. robertsii* IM6519. W pracy opisałam bardzo zróżnicowany i złożony szlak degradacji 4-*n*-NP, oparty na licznych równoczesnych reakcjach mono- i dihydroksylacji, zarówno w łańcuchu alifatycznym, jak również (na późniejszych etapach) w pierścieniu aromatycznym, charakteryzujący się dużą dynamiką zachodzących przemian.

Pojawienie się pochodnych posiadających dwie grupy hydroksylowe w pierścieniu aromatycznym może sugerować, iż w czasie degradacji badanego ksenobiotyku dochodzi do rozszczepienia pierścienia i powstania produktów, które są składowymi cyklu Krebsa¹². Obserwacja ta skłoniła mnie do przeprowadzenia badań mających na celu sprawdzenie zdolności do mineralizacji badanego ksenoestrogenu przez *M. robertsii* IM6519. W tym celu, zastosowałam 4-*n*-NP znakowany izotopem ¹⁴C w pierścieniu aromatycznym ([ring-¹⁴C(U)]-labeled 4-*n*-NP). Stwierdziłam, że ilość uwolnionego ¹⁴CO₂ wynosiła 38% po 96h inkubacji, co pozwala sądzić, iż w czasie procesu degradacji dochodzi do rozszczepienia pierścienia aromatycznego i mineralizacji, a tym samym całkowitego usunięcia badanego ksenobiotyku ze środowiska wzrostu. Jest to niezwykle korzystne, gdyż nie dochodzi do akumulacji metabolitów, które mogą być toksyczne i szkodliwe dla środowiska naturalnego.

*Do najważniejszych osiągnięć tej pracy zaliczam opisanie szlaku degradacji nonylofenolu złożonego z kilkadziesiątu pochodnych. Zaproponowany przeze mnie szlak rozkładu nonylofenolu przez *M. robertsii* jest unikatowy, gdyż opiera się na licznych równoczesnych reakcjach mono i dihydroksylacji, zachodzących zarówno w łańcuchu alifatycznym jak i w pierścieniu aromatycznym. Wykazana w pracy mineralizacja nonylofenolu świadczy o zdolności badanego grzyba do całkowitego usuwania badanego ksenobiotyku ze środowiska wzrostu.*

Uwidocznienie wysokich zdolności degradacyjnych *Metarhizium* sp., skłoniło mnie do zbadania, czy drugi ksenoestrogen EE2 (17 α -etynyloestradiol), również często wykrywany w środowisku jak nonylofenol, może być także eliminowany przez grzyby strzępkowe wyodrębnione ze skażonych gleb.

Do badań wykorzystałam 38 szczepów grzybów mikroskopowych, z których cztery należały do rodzaju *Metarhizium* [4]. Zaadaptowałam ilościową metodę

¹² Krupiński, M., Szewczyk, R., Długoński, J. (2013). Detoxification and elimination of xenoestrogen nonylphenol by the filamentous fungus *Aspergillus versicolor*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 82: 59–66.

oznaczania EE2 korzystając z nowoczesnej techniki - tandemowej spektrometrii mas i chromatografii cieczowej (LC-MS/MS), jak również zaadaptowałam nową technikę ekstrakcji metodą *QuEChERS*. Zastosowane metody analityczne umożliwiły mi oznaczenie zawartości substratu w ekstraktach pochodzących. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdziłam, że zastosowane w pracy szczepy *Metarhizium robertsii* oznaczone numerami 6511, 2358, 6519 oraz 2234 wykazują zdolność do usuwania syntetycznego estrogenu ze środowiska wzrostu a ubytek substratu po 3 dniach inkubacji wynosił odpowiednio 88,5; 76,5; 55,2 oraz 83,7%. W pracy wykazałam również, że inne grzyby, należące do rodzaju *Aspergillus* utylizują badany substrat w czasie 24h inkubacji, a zasolenie środowiska tylko nieznacznie hamowało transformację EE2 do estradiolu a następnie estronu.

Wyniki przedstawione w tej pracy pozwoliły mi stwierdzić, że grzyby strzępkowe z rodzaju Metarhizium są zdolne do eliminacji syntetycznych estrogenów. Ponadto w publikacji tej wykazałam, że oprócz badanych grzybów entomopatogennych, także pozostałe badane szczepy posiadają zdolność do transformacji EE2 do mniej toksycznych pochodnych i cecha ta jest zachowana w środowiskach zasolonych.

Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki, wydaje się, że *M. robertsii* może być stosowany do eliminacji badanych ksenoestrogenów nie tylko w zanieczyszczonym środowisku, ale również w warunkach kontrolowanych z użyciem bioreaktorów, z których po zakończeniu procesu będzie powstawała grzybnia odpadowa. Dane literaturowe wskazują, że zagospodarowanie biomasy odpadowej po degradacji ksenobiotyków jest poważnym problemem, który czeka na optymalne rozwiązanie¹³. Prowadzone dotychczas badania koncentrują się głównie na zastosowaniu takiej biomasy do akumulacji metali ciężkich, choć nieliczne doniesienia sugerują także możliwość wykorzystania tego odpadu w procesach syntezy¹⁴.

W przeprowadzonych przeze mnie pracach badawczych zaproponowałam innowacyjne podejście polegające na syntezie nanocząstek srebra z biomasy odpadowej *M. robertsii* pozostałej po procesie biodegradacji nonylofenolu [5].

¹³ Ahluwalia S., Goyal D. (2007). Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresour Technol.* 98(12):2243-57.

¹⁴ Tamboli D., Kagalkar A., Jadhav M., Jadhav J., Govindwar S. (2010). Production of polyhydroxyhexadecanoic acid by using waste biomass of *Sphingobacterium* sp. ATM generated after degradation of textile dye Direct Red 5B. *Bioresour Technol.* 101(7):2421-7.

Dodatkowo, w eksperymentach, w celach porównawczych, zastosowałam kontrolną biomasę (hodowaną bez dodatku nonylofenolu). Wykazałam, że nanocząstki srebra powstają po 24 godzinnej inkubacji z dodatkiem różnych stężeń ekstraktów z biomasy (25, 50, 75, 100%). Ponieważ otrzymane wyniki były zadawalające, ale czas syntezy okazał się być zbyt długi, zastosowałam naświetlanie ($1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) przez 3 h. Otrzymane wyniki jednoznacznie udowodniły, że zastosowanie zjawiska fotoindukcji znacząco skróciło czas biosyntezy nanocząstek, a największą wydajność produkcji zaobserwowano dla prób z dodatkiem 25 i 50% ekstraktów z biomasy odpadowej (otrzymanej po degradacji nonylofenolu). Widma UV-Vis uzyskane dla tych koloidów sugerowały, że nanocząstki te mają małe rozmiary i są bardziej monodispersyjne, co jest ważnym czynnikiem przy ich późniejszym zastosowaniu.

Istotną częścią tej pracy było nie tylko wykazanie możliwości otrzymywania z nanocząstek srebra grzybni odpadowej, ale też ich dokładne scharakteryzowanie, co umożliwi ich późniejsze zastosowanie. W celu określenia rozmiarów nanocząstek, nawiązałam współpracę z Katedrą Chemii i Technologii Materiałów UŁ, co umożliwiło mi zwymiarowanie tych molekuł technikami STEM (Skaningowa Elektronowa Mikroskopia Transmisyjna) oraz DLS (Dynamiczne Rozpraszanie Światła). Wykazałam, że nanocząstki syntezowane przez ekstrakty biomasy odpadowej mają mniejsze rozmiary (od 2 do 29 nm) i są bardziej monodispersyjne w porównaniu do otrzymywanych z ekstraktów grzybni kontrolnej. Przeprowadzone badania otrzymanych nanocząstek techniką EDS (Spektrometria Dyspersji Energii Promieniowania Rentgenowskiego), potwierdziły obecność srebra w analizowanych koloidach, natomiast badania z wykorzystaniem techniki TGA (Analiza Termogravimetryczna) umożliwiły oszacowanie ilości substancji organicznej znajdującej się w nanocząstkach. Ponadto przeprowadziłam badania stabilności nanocząstek w podłożu hodowlanym, buforze PBS i wodzie, które potwierdziły stabilność syntetyzowanych koloidów w czasie 4 tygodni, co jest niezwykle korzystne podczas ich praktycznego stosowania.

Dzięki zastosowaniu techniki FT-IR (spektrofotometria z transformacją fourierowską), otrzymałam widma oscylacyjne, na których zidentyfikowano charakterystyczne pasma absorpcyjne dla wiązań N-H i C=O sugerujące obecność wiązań peptydowych w badanych nanocząstkach. Wyniki te zostały potwierdzone dodatkowo techniką XPS (spektroskopia fotoelektronów w zakresie promieniowania X), dzięki której dodatkowo wykazano obecność wiązań N-C, które również wskazują

na obecność wiązań peptydowych i sugerują obecność białek lub peptydów na powierzchni syntezowanych nanocząstek srebra. W celu potwierdzenia zaangażowania białka w syntezę tych nanostruktur zastosowałam różne inhibitory enzymów, które umożliwiły mi wykazanie zahamowania reakcji syntezy w obecności KCN.

Nanocząstki srebra znalazły zastosowanie w wielu różnych dziedzinach¹⁵. W pracy [5] przedstawiłam dwie możliwości aplikacyjne wytworzonych koloidów – jako katalizatora w reakcjach chemicznych oraz jako czynnika przeciwdrobnoustrojowego. W badaniach przeprowadziłam reakcje redukcji 4-nitrofenolu oraz błękitu metylenowego przez NaBH₄ zachodzące w obecności otrzymanych nanocząstek srebra jako katalizatora. Otrzymane wyniki sugerują, że nanocząstki srebra syntezowane przez grzybnię odpadową *M. robertsii* wykazują wyższe własności katalityczne w porównaniu do nanocząstek wytworzonych z grzybni kontrolnej. Z przeprowadzonych badań właściwości antybakteryjnych otrzymanych koloidów wynika, że dodatek 30 ppm srebra w postaci nanocząstek powodował zahamowanie wzrostu *S. aureus* i *E. coli*. Oznaczenia żywotności bakterii testem fluorescencyjnym z barwnikiem Alamar blue wykazały, że nanocząstki syntezowane z biomasy odpadowej mają silniejsze właściwości przeciwdrobnoustrojowe w porównaniu do kontrolnych. Ponadto, stosując technikę skaningowej mikroskopii konfokalnej przedstawiłam dowody, że mechanizm działania badanych nanocząstek związany był z uszkodzeniami osłon komórkowych.

Podsumowując wyniki otrzymane w pracy [5], stwierdziłam, że nanocząstki srebra otrzymywane z ekstraktów z biomasy odpadowej charakteryzują się mniejszymi rozmiarami i większą monodispersyjnością w stosunku do nanocząstek otrzymanych z biomasy kontrolnej, co wpływa na ich lepsze właściwości katalityczne i przeciwdrobnoustrojowe i mogą być stosowane w praktyce.

Podsumowanie:

W pracach włączonych do osiągnięcia naukowego wykazałam, że grzyby entomopatogenne mają zdolność do biodegradacji ksenoestrogenów, opisałam mechanizmy umożliwiające tym drobnoustrojom przeżywanie w obecności wysokich

¹⁵ Adil S., Assal M., Khan M., Al-Warthan A., Siddiqui M., Liz-Marzán L. (2015). Biogenic synthesis of metallic nanoparticles and prospects toward green chemistry. Dalton Trans. 44(21):9709-17.

stężeń ksenobiotyków, jak również wskazałam możliwość wykorzystania biomasy odpadowej uzyskanej po procesie degradacji do produkcji nanocząstek srebra. Za najważniejsze wyniki uważam:

1. Wykazanie, że grzyby z rodzaju *Metarhizium* sp., o potwierdzonej zdolności do infekowania owadów, są zdolne do usuwania nonylofenolu.
2. Przedstawienie dowodów, że powstające w czasie usuwania nonylofenolu zmiany morfologiczne *M. robertsii* są zależne od ilości dodawanego substratu, a ich zanik świadczy o zakończeniu procesu degradacji.
3. Wykazanie, że zmiany w morfologii peletek (występujące w początkowych godzinach hodowli) w obecności NP są powiązane z ich obniżoną aktywnością metaboliczną (żywołnością), jak również są wynikiem zmian w ultrastrukturze strzępek i składzie ściany komórkowej.
4. Przedstawienie przekonujących argumentów, że pomiary wielkości peletek i obserwacje mikroskopowe *M. robertsii* mogą stanowić szybką metodę monitorowania przebiegu procesu degradacji.
5. Opisanie nowo wyizolowanego szczepu *M. robertsii* charakteryzującego się nie tylko zdolnością do degradacji nonylofenolu, ale także do jego mineralizacji.
6. Zaproponowanie nowego, złożonego szlaku degradacji nonylofenolu przez grzyby strzępkowe, opartego na 34 pochodnych, w którym występują liczne, równoczesne reakcje mono i dihydroksylacji zarówno w łańcuchu alifatycznym, jak również (na późniejszych etapach) w pierścieniu aromatycznym.
7. Wykazanie, że szczepy grzybów strzępkowych *Metarhizium robertsii* są zdolne do utylizacji syntetycznego estrogenu 17α -etynyloestradiolu.
8. Przedstawienie argumentów, że grzybnia odpadowa *M. robertsii* pozostała po procesie degradacji nonylofenolu może być ponownie wykorzystywana np. do produkcji nanocząstek srebra.
9. Wykazanie, że nanocząstki srebra otrzymane z ekstraktów z biomasy odpadowej *M. robertsii* posiadają odpowiednie parametry fizyko-chemiczne i mogą być z powodzeniem stosowane jako katalizatory w reakcjach biodegradacji lub jako czynniki antybakteryjne.

Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Prace naukowe nie wchodzące w skład osiągnięcia są cytowane zgodnie z wykazem opublikowanych prac naukowych (Załącznik 7: pkt. II.A).

A). Autorstwo i współautorstwo publikacji naukowych

W latach 1992-1997 studiowałam na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego (kierunek biologia, specjalność mikrobiologia). Pracę magisterską wykonałam w Zakładzie Mikrobiologii Przemysłowej (obecnie Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii UŁ), pod opieką prof. dr hab. Jerzego Długońskiego. Po obronie pracy magisterskiej, zatytułowanej „Mikrobiologiczna degradacja związków ropopochodnych w obecności metali ciężkich”, zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w tej samej jednostce organizacyjnej UŁ. Po rozpoczęciu pracy naukowej, kontynuowałam badania rozpoczęte w ramach pracy magisterskiej, które były finansowane z projektu Unii Europejskiej DG XII, INCO-Copernicus: No. IC15-CT96-0716. Otrzymane przeze mnie wyniki ukazały się w formie publikacji, w której wykazałam przydatność nowo wyizolowanych szczepów bakteryjnych do eliminacji PAH w obecności metali ciężkich [IIA. 1]. W kolejnych latach moje zainteresowania badawcze skierowały się w stronę wykorzystania drożdży rozszczepkowych jako eukariotycznego modelu badawczego. W czasie prowadzenia tych badań odbyłam półroczny naukowy staż zagraniczny w Institute of Cell Biology, University of Bern (Szwajcaria) w zespole Prof. Ernsta Schweingruber (09.2002 – 03.2003). Uczestniczyłam także w dwutygodniowym kursie „EMBO Practical course – Molecular Genetics with the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*” w Kopenhadze w Danii.

Głównym celem mojej pracy doktorskiej zatytułowanej „Drożdże rozszczepkowe *Schizosaccharomyces pombe* jako model w badaniu detoksykacji androgenów” wykonanej pod kierunkiem prof. Jerzego Długońskiego było badanie mechanizmów detoksykacji szkodliwych związków u drożdży rozszczepkowych, a także poznanie enzymu i procesów odpowiedzialnych za biotransformację toksycznych substratów. Praca ta była częściowo dofinansowana w ramach grantu międzynarodowego, otrzymanego z Unii Europejskiej, DGXII, program INCO-Copernicus, No IC15-CT96-0716, w których uczestniczyłam jako wykonawca oraz w ramach 4 grantów UŁ, których byłam kierownikiem. Pracę doktorską obroniłam na

Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska UŁ w 2003 r., uzyskując stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii. Badania te kontynuowałam, a uzyskane wyniki dotyczące przydatności różnicowej kalorymetrii skaningowej do badania toksycznego wpływu androgenów środowiskowych na *S. pombe* zawarłam w pracy **[IIA. 10]**, której byłam autorem korespondencyjnym.

Po obronie pracy doktorskiej, zajęłam się tematami badawczymi umożliwiającymi mi zastosowanie mikroskopii konfokalnej w badaniach mikrobiologicznych. Swoją wiedzę, zdobytą między innymi podczas kursu „Flow cytometry and fluorescence microscopy” (Etten-Leur, Holandia), dotyczącą zastosowania mikroskopii fluorescencyjnej, konfokalnej i cytometrii przepływowej wykorzystałam m. in. do badania wpływu wybranych związków chemicznych na biofilmy bakteryjne.

Dzięki współpracy, którą nawiązałam z pracownikami Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ, wykonałam szereg badań obejmujących zastosowanie mikroskopii konfokalnej zmierzających do określenia wpływu antybiotyków, enzymów i związków pochodzenia naturalnego na powstawanie i eradykację biofilmów tworzonych przez gronkowce. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w 5 publikacjach oryginalnych **[IIA. 3, 5, 7, 8, 9]**. Zastosowanie mikroskopii konfokalnej pozwoliło wykazać, że synergistyczne działanie lizostafiny (dodawanej w stężeniu podprogowym) i oksacyliny powodowało najbardziej efektywne usuwanie biofilmów MRSA (*Staphylococcus aureus* odporne na metycylinę) i MSSA (*S. aureus* wrażliwe na metycylinę). Stwierdzono także, że zastosowanie trzech cykli terapii lizostafyną (dodawaną w stężeniu podprogowym) i linezolidem spowodowało zniszczenie struktury wszystkich badanych biofilmów **[IIA. 3, 5]**.

W kolejnej pracy, do eradykacji biofilmów tworzonych przez gronkowce, zastosowano substancje pochodzenia naturalnego **[IIA. 7]**. Analizy z użyciem mikroskopu konfokalnego (LSM 5 Pascal, Zeiss) oraz oprogramowania PHLIP umożliwiającego określenie struktury biofilmu wykazały, że diterpenoidy wyizolowane z *S. scalarea* zmieniały parametry morfologiczne biofilmów *S. aureus* i nasilały działanie antybiotyków beta-laktamowych.

Za najbardziej prawdopodobny mechanizm działania tych związków uznano zmianę hydrofobowości powierzchni oraz przepuszczalności ściany komórkowej badanych gronkowców. Podobne działanie zaobserwowano dla mannoproteiny (wykazującej aktywność surfaktanta) wyizolowanej ze ściany komórkowej drożdży *S.*

cerevisiae [IIA. 8] oraz dla surfaktantów z uzyskanych z bakterii *Lactobacillus acidophilus* [IIA. 9], które ograniczały tworzenie się biofilmu gronkowców, a także zmieniały parametry wytworzonego wcześniej biofilmu. Opracowane przez mnie metody obrazowania biofilmów bakteryjnych z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej i analizy obrazu, umożliwiły mi nawiązanie współpracy z Zakładem Immunobiologii Bakterii UŁ. Otrzymane przeze mnie wyniki pozwoliły wykazać, że biosurfaktanty izolowane z *Bacillus subtilis* również mają właściwości bakteriobójcze, antyadhezyjne i hamują tworzenie biofilmów drobnoustrojów Gram-ujemnych [IIA. 25].

Doświadczenie zdobyte w obrazowaniu biofilmów bakteryjnych umożliwiło mi zajęcie się nie tylko czynnikami powodującymi efektywne usuwanie biofilmów bakteryjnych, lecz również czynnikami umożliwiającymi tworzenie tych złożonych, wielokomórkowych struktur. W jednej z prac oznaczałam wpływ acylowanych laktonów homoseryny (odpowiedzialnych za zjawisko „quorum sensing”) na tworzenie biofilmu przez *Proteus mirabilis* O18, jak również zmianę ich parametrów morfologicznych. Okazało się, że badany drobnoustrój wykazywał dużą wrażliwość na obecność laktonu N-butyrylo-homoseryny, który powodował zwiększenie grubości biofilmu [IIA. 12]. W kolejnej pracy badawczej, dzięki zastosowaniu podwójnego barwienia (SYTO 13 i WGA-TRITC) przeprowadziłam za pomocą mikroskopii konfokalnej ilościową analizę wytwarzania polisacharydów *P. mirabilis*. Technika tą udało się wykazać, że zarówno czynniki stresowe jak i odżywcze powodowały nadprodukcję oznaczanych biopolimerów, a także powodowały zmianę struktury biofilmu badanych szczepów [IIA. 19].

Korzystając z doświadczenia zdobytego w czasie pobytu na stażu zagranicznym w University of Bern (Szwajcaria), a także na kursie w Etten-Leur w Danii z zakresu biologii molekularnej grzybów brałam udział w badaniach ekspresji genu cytochromu P-450 i reduktazy cytochromu P-450 u grzybów strzępkowych *Cunninghamella elegans*, w ramach których wykonałam sekwencjonowanie i analizę bioinformatyczną otrzymanych amplikonów [IIA. 6].

Swoją wiedzę dotyczącą zastosowania technik mikroskopowych i analizy obrazu, zastosowałam także w badaniach dotyczących tworzenia się wolnych rodników w reakcjach obronnych pomidora w odpowiedzi na stres związany z porażeniem przez *Botrytis cinerea* [IIA. 2, 20] przeprowadzonych we współpracy z Katedrą Fizjologii i Biochemii Roślin UŁ.

Ponieważ moje zainteresowania badawcze w dalszym ciągu zmierzały w stronę możliwości stosowania mikroskopii konfokalnej w badaniach mikrobiologicznych, nawiązałam współpracę z Centrum Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi, w ramach której opracowałam metodę umożliwiającą oznaczenie liczby komórek dzielących się mutantów *Mycobacterium smegmatis*. Metoda ta przyczyniła się do wyjaśnienia zależności pomiędzy naprawą uszkodzeń obu nici DNA na drodze rekombinacji homologicznej lub naprawy poprzez scalanie niehomologicznych końców DNA (NHEJ) [IIA. 4]. Wykorzystując nabyte doświadczenie w obszarze badawczym dotyczącym obrazowania prątków, w kolejnej pracy (wykonanej we współpracy z Katedrą Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ) przeprowadziłam badania kolokalizacji *Mycobacterium tuberculosis* z markerami endosomalnych fagocytów Rab5 i Rab7, potwierdzające zdolność prątków do przeżywania wewnątrz fagosomów w czasie infekcji [IIA. 17].

Kolejnym tematem, który wzbudził moje zainteresowanie były nowosyntetyzowane substancje o plejotropowej aktywności biologicznej, jakimi są dendrymery. W pracach, w których wykazano aktywność przeciwdrobnoustrojową zarówno dendrymerów polipropylenoiminowych [IIA. 13], jak i skojarzone działanie tych makromolekuł z antybiotykiem [IIA. 24], przeprowadziłam badania przepuszczalności bakteryjnych osłon komórkowych z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej i analizy obrazu. Otrzymane przeze mnie wyniki wskazują, że wszystkie badane nanopolimery zaburzały przepuszczalność bakteryjnych osłon komórkowych, a skojarzone działanie dendrymerów polipropylenoiminowych z amoksyliną powodowało zwiększenie tych uszkodzeń. Moje zainteresowanie tymi nanocząsteczkami zaowocowało podjęciem współpracy z Zakładem Zaburzeń Krzepnięcia Krwi Uniwersytetu Medycznego w Łodzi efektem czego była wspólna publikacja dotycząca wpływu dendrymerów poliamidoaminowych (PAMAM) czwartej generacji na zmniejszenie się hiperglikemii i odtworzenie uszkodzonej bariery krew – mózg [IIA. 14].

Kolejny wątek badawczy, w którym uczestniczyłam to badania wpływu metali ciężkich na *Peacilomyces marquandii*. W pracy wykazano, że zastosowane związki powodowały zmiany w składzie fosfolipidów błonowych, co znalazło potwierdzenie w przeprowadzonych przeze mnie badaniach przepuszczalności osłon komórkowych u badanego drobnoustroju [IIA. 16]. W innej publikacji, w której sprawdzano zdolność grzybów strzępkowych *Myrothecium roridum* oraz *Penicillium pinophilum* do

dekoloryzacji zieleni malachitowej, przeprowadziłam badania akumulacji tego związku w komórkach grzyba, jak również analizę obrazu wskazującą na występowanie zmian w morfologii strzępek [IIA. 15].

W tym samym czasie zainteresowałam się także związkami wykazującymi działanie grzybobójcze. W badaniach, wykonanych we współpracy z Katedrą Chemii Fizycznej UŁ wykazałam, że fungicyd tebukonazol inkludowany w β -cyklodekstrynie, był tak samo efektywnym czynnikiem grzybobójczym (w stosunku do *Aspergillus fumigatus*) jak związek wyjściowy [IIA. 22], ale modyfikacja ta powodowała znaczące zwiększenie rozpuszczalności tego związku w wodzie, co znacząco ułatwiało jego stosowanie.

W trakcie pracy w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii UŁ na stanowisku adiunkta w latach 2009-2010 uczestniczyłam jako wykonawca w badaniach dotyczących projektu rozwojowego „Opracowanie enzymatycznego odkażalnika do usuwania skażeń spowodowanych sarinem i iperytem siarkowym”. W konsorcjum zaangażowane były także instytucje o charakterze wojskowym (Wydział Nowych Technologii i Chemii z Wojskowej Akademii Technicznej, Wojskowy Instytut Chemii i Radiometrii), jak również partner z sektora biznesu - POCh S.A. W ramach tego projektu poszukiwałam enzymów zdolnych do unieszkodliwiania bojowych środków trujących. Otrzymane enzymy przekazano do partnerów wojskowych konsorcjum, gdzie opracowano odkażalnik do usuwania gazów bojowych. Sposób uzyskiwania preparatu enzymatycznego oraz wytwarzania odkażalnika bojowych środków trujących nie podlegały publikacji.

W 2009 r. wykonałam także badania aktywności biologicznej nanocząstek srebra dla grupy Staszów sp. z o.o. (marka Hipovet) w ramach realizacji umowy pomiędzy UŁ a grupą Staszów, które zaowocowały wdrożeniem na rynek preparatów pielęgnacyjnych dla koni z dodatkiem nanosrebra.

Innym kierunkiem badań, którym zajmowałam się równolegle do prac prowadzonych z zakresu mikroskopii konfokalnej, była biodegradacja ksenobiotyków przez grzyby strzępkowe. Badania te stanowiły fragment specjalnego projektu badawczego realizowanego w latach 2007–2009 przez Katedrę Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii UŁ, w ramach programu wykonawczego pomiędzy Ministerstwem Nauki i Informatyzacji Rzeczypospolitej Polskiej a Ministrem Edukacji i Nauki Królestwa Hiszpanii (nr projektu 31/HIS/2007/02), i prowadzone były we współpracy z Prof. Christianem Kennesem z University of La Coruña. Jak już

wcześniej wspominałam, jednym z bardziej toksycznych ksenobiotyków jest nonylofenol, który jest nie tylko toksyczny dla organizmów żywych, ale także jest zakłóca prawidłowe funkcjonowanie układu endokrynnego. W przeprowadzonych przeze mnie badaniach wykazałam, że jeden z gatunków grzyba strzępkowego był zdolny do wydajnego usuwania tego związku z podłoża hodowlanego na drodze kometabolizmu. Analiza jakościowa techniką GC-MS wykazała obecność produktów rozkładu tego związku [IIA. 11].

Inne prace badawcze, miały na celu sprawdzenie zdolności grzyba strzępkowego do usuwania tributyllocyny w obecności estradiolu. Okazało się, że estrogen przyspieszał rozkład związku cynoorganicznego, a wykazane przeze mnie zmiany w przepuszczalności osłon komórkowych tego grzyba były powiązane ze zmianami w składzie fosfolipidów błonowych [IIA. 21]. W kolejnej pracy, dotyczącej optymalizacji procesu biodegradacji alachloru przez grzyba strzępkowego *Paecilomyces marquandii*, finansowanej z projektu NCN nr UMO-2011/01/B/NZ9/02898 pt. „Mikrobiologiczna degradacja ksenoestrogenów i estrogenów w obecności metali ciężkich i NaCl”, którego byłam głównym wykonawcą, przeprowadziłam detekcję reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach grzyba *in vivo*, za pomocą mikroskopii konfokalnej i specjalistycznego barwienia [IIA. 23]. Otrzymane wyniki dowiodły, że produkcja ROS była indukowana w hodowlach z nieregulowanym pH, natomiast zredukowana w układach w których pH utrzymywano na stałym poziomie. W związku z tym, wykonałam oznaczenia aktywności enzymów antyoksydacyjnych - dysmutazy nadadtlenkowej (SOD) i katalazy (CAT), które potwierdziły wyniki z mikroskopii konfokalnej i wskazywały na aktywną odpowiedź grzyba na stres oksydacyjny wywołany obecnością alachloru.

Podsumowanie dorobku publikacyjnego:

Typ publikacji	I Przed doktoratem			II Po doktoracie			Razem (I+II)		
	Liczba	IF	Punkty MNiSW	Liczba	IF	Punkty MNiSW	Liczba	IF	Punkty MNiSW
Oryginalne - czasopisma z bazy JCR	1	0,505	13	29	62,028	725	30	62,533	738
- recenzowane czasopisma polskojęzyczne spoza JCR	2			2			4		
Rozdziały w książkach				1		4	1		4
RAZEM	3	0,505	13	32	62,028	729	35	62,533	742
Doniesienia konferencyjne									
Konferencje międzynarodowe	3			26			29		
Konferencje krajowe	4			24			28		
RAZEM	7			50			57		

Liczba cytowań publikacji z dnia 03.04.2016:

316 – według bazy Web of Science

Indeks Hirscha z dnia 03.04.2016:

10 – według bazy Web of Science

B). Udział w projektach badawczych

1. Grant międzynarodowy otrzymany z Unii Europejskiej, DG XII, INCO_COPERNICUS (IC 15-CT 96-0716), realizowany w latach: 1997-1999. „Biodegradation of toxic organic compounds in waste water and accumulation of heavy metals” – wykonawca.
2. Grant międzynarodowy otrzymany z Unii Europejskiej, DG XII, INCO_COPERNICUS (IC 15-CT 98-0114), realizowany w latach: 1999-2001. „Characterization of fresh and deposited sludges of the Moscow region and development of strategies of a utilization in composting processes, agriculture or horticulture” – wykonawca.
3. Projekt badawczy specjalny „Mikrobiologiczne usuwanie toksycznych związków organicznych oraz metali ciężkich”. Finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego Rzeczypospolitej Polskiej oraz Ministerstwo Edukacji Królestwa Hiszpanii. Nr wniosku: 31/HIS/2007/02 (realizowany w latach: 2007 – 2010) – wykonawca.
4. Projekt „Laboratorium Ochrony Środowiska” Finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego Rzeczypospolitej Polskiej. Nr wniosku: WKP_1/1.4.3/2/2005/88/208/510/2007/U. (realizowany w latach: 2007 – 2008) – wykonawca.
5. Projekt rozwojowy „Opracowanie enzymatycznego odkażalnika do usuwania skażeń spowodowanych sarinem i iperytem siarkowym” Finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego Rzeczypospolitej Polskiej. Nr wniosku: OR 00005305 (realizowany w latach: 2009 – 2010) – wykonawca.
6. Grant Uniwersytetu Łódzkiego „Badania biokonwersji szkodliwych związków organicznych z wykorzystaniem drożdży *Schizosaccharomyces pombe*”. Nr wniosku: 505/442-433 (realizowany w latach: 2005 – 2008) – kierownik.
7. Projekt badawczy: „Mikrobiologiczna degradacja ksenoestrogenów i estrogenów w obecności metali ciężkich i NaCl” (2011 – 2014). Finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego Rzeczypospolitej Polskiej. Nr wniosku: UMO-2011/01/B/NZ9/02898 – główny wykonawca.

C). Staże zagraniczne i szkolenia (krajowe i zagraniczne)

- Staż zagraniczny w Institute of Cell Biogy, University of Bern (Szwajcaria) w zespole Prof. Ernsta Schweingruber (09.2002 – 03.2003).
- Szkolenie „EMBO Practical course – Molecular genetics with the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*” w Institute of Molecular Biology, University of Copenhagen w Danii, koordynator: Prof. Richard Egel (11.06.-23.06.2000)
- Szkolenie “Flow cytometry and fluorescence microscopy” (26.04.-28.04.2000; Etten-Leur, Holandia)
- Course “LC-MS/MS - Mass spectrometry and liquid chromatography” (26. 04.-28.04.2011) Lublin, Poland
- Szkolenie „5800 MALDI Tof/Tof” 19-20 wrzesień 2013, Łódź, Poland.
- Warsztaty “Grzyby mikroskopowe *Micromycetes* – kultury akseniczne, genomy, identyfikacja molekularna” , 4.06.-6.06. 2013, Poznań.

D) Uzyskane nagrody

- 1999 r. Nagroda Zespołowa Rektora UŁ II-go stopnia
- 2007 r. Nagroda Zespołową Rektora UŁ I-go stopnia za cykl publikacji
- Wyróżnienie w konkursie na najlepsze doniesienie zaprezentowane podczas Ogólnopolskich Warsztatów Mikrobiologia w Ochronie Zdrowia i Środowiska „MIKROBIOT” w 2008 r.
- 2012 r. Nagroda Zespołową Rektora UŁ I-go stopnia za cykl publikacji
- 2013 r. za swoją pracę została odznaczona Brązowym Krzyżem Zasługi.
- 2015 r. Nagroda Zespołowa Rektora UŁ 1-stopnia za cykl publikacji pt.”Badanie mechanizmów ograniczających szkodliwe oddziaływanie substancji toksycznych na komórki drobnoustrojów i organizmów wyższych”

E). Członkostwo w towarzystwach naukowych

- W latach 2004–2008 pełniłam funkcję vice-przewodniczącej Łódzkiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów.
- W latach 2014–2015 byłam członkiem międzynarodowego towarzystwa naukowego International Biodeterioration & Biodegradation Society (IBBS)
- Od 2013 r. należę do Polskiego Towarzystwa Mykologicznego (PTMyk)

F) Recenzje publikacji i projektów badawczych

Jestem recenzentem publikacji naukowych, nadesłanych do redakcji czasopism naukowych: Polish Journal of Microbiology, Journal of Hazardous Materials, Journal of Zhejiang University Science B oraz Inżynieria i Aparatura Chemiczna. Ponadto jestem recenzentem projektów badawczo rozwojowych dla NCBiR.

OMÓWIENIE DZIAŁALNOŚCI DYDAKTYCZNEJ I ORGANIZACYJNEJ

Omówienie działalności i osiągnięć dydaktycznych

W ramach działalności dydaktycznej prowadziłam i prowadzę do dzisiaj, wykłady z genetyki grzybów dla studentów biotechnologii oraz jestem koordynatorem ćwiczeń z tego przedmiotu. Ponadto, moja działalność dydaktyczna obejmuje prowadzenie zajęć laboratoryjnych z mikrobiologii przemysłowej, mykologii, biotechnologii środowiskowej, biotechnologii żywności, biotechnologii mikrobiologicznej oraz z zastosowania drobnoustrojów w ochronie środowiska dla studentów pierwszego i drugiego stopnia kierunków Mikrobiologia i Biotechnologia. Opracowałam i prowadzę pracownie specjalistyczne oraz ćwiczenia dla studentów na kierunkach Biologia, Biotechnologia i Mikrobiologia oraz pracownię „Biotechnologia wody” dla studentów kierunku Ochrona Środowiska.

Przygotowałam również ćwiczenia laboratoryjne w ramach podyplomowego Studium Ekologii i Ochrony Środowiska dla Nauczycieli. Prowadzę także pracownie dotyczące zastosowania technik izotopowych oraz mikroskopii konfokalnej w badaniach mikrobiologicznych i biotechnologicznych, w ramach cyklu pracowni specjalistycznych, w których uczestniczą magistranci kierunku biotechnologia, specjalność biotechnologia mikrobiologiczna, wykonujący pracę magisterską w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii UŁ.

Jestem również koordynatorem pracowni specjalistycznych dla studentów drugiego stopnia kierunku mikrobiologia oraz biotechnologia. W ramach działalności dydaktycznej prowadziłam również seminaria dla pierwszego stopnia kierunku Biotechnologia. Od 2004 roku byłam promotorem 5 prac magisterskich na kierunku biologia i 9 prac licencjackich na kierunku mikrobiologia i biotechnologia, jak również

bezpośrednim opiekunem 22 doświadczalnych prac magisterskich na kierunku biologia i biotechnologia.

Do dorobku dydaktycznego zaliczam też autorstwo rozdziału w podręczniku akademickim, pt. „Drobnoustroje udoskonalone genetycznie w ochronie środowiska” w podręczniku akademickim „Mikrobiologia techniczna” (pod redakcją: Z. Libudzisz, K. Kowal i Z. Żakowskiej), wydany przez PWN w 2009 roku.

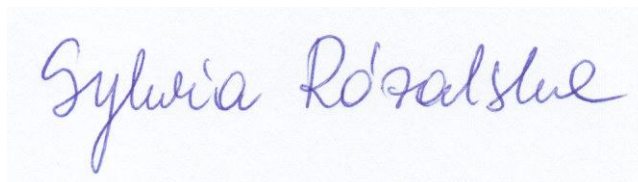
Od 2005 roku sprawuję opiekę nad studentami wykonującymi projekty badawcze w ramach Studenckiego Koła Biotechnologiczno-Mikrobiologicznego „Bio-Mik”, jak również wspieram ich aktywność naukową, czego odzwierciedleniem są doniesienia konferencyjne prezentowane podczas Ogólnopolskich Akademickich Seminariów Studentów Biotechnologii (ASSB) oraz na konferencjach, między innymi, w Poznaniu, Wrocławiu i na warsztatach „Mikrobiot” odbywających się w Łodzi. Ponadto w roku akademickim 2007/2008 pełniłam funkcję opiekuna roku studentów studiów wieczorowych na kierunku Biotechnologia.

Omówienie pracy organizacyjnej i działalności popularyzatorskiej:

W ramach działalności organizacyjnej na rzecz Uniwersytetu byłam członkiem Komisji ds. Kadrowych (Podzespół do Spraw Pracowników Bibliotecznych i Naukowo-Technicznych) w latach 2004-2008. W 1999 roku zostałam powołana na członka Komisji ds. Biologii Gleby (nr. 190) przy Polskim Komitecie Normalizacyjnym, gdzie aktywnie działam do dziś, zajmując się przygotowaniem, opiniowaniem, opracowywaniem i tłumaczeniem 33 Norm ISO. Ponadto jestem członkiem Międzywydziałowego Centrum Nanotechnologii Uniwersytetu Łódzkiego.

W 2014 r. byłam zaangażowana w organizację „XVI International Biodeterioration and Biodegradation Symposium” odbywającego się w dniach 3-5 września 2014 r. w Łodzi. Byłam także członkiem komitetu organizacyjnego Warsztatów Polskiego Towarzystwa Mykologicznego PTMyk (do którego należę od roku 2013), które odbyły się w Łodzi w dniach 24-28 września 2014 r. Uczestniczyłam także w tworzeniu warsztatów biotechnologicznych – „Micromycetes w ochronie środowiska” z zastosowania mikroskopii fluorescencyjnej i konfokalnej w badaniach grzybów. W ramach działalności organizacyjnej uczestniczyłam w akcjach promujących naukę wygłaszając referat w ramach VI Festiwalu Nauki i Sztuki w Łodzi (20 kwietnia 2006, Zagrożenia zdrowotne XXI wieku). W roku 2008 i 2010

prezentowałam Katedrę Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii oraz Laboratorium Ochrony Środowiska UŁ na Targach Bioforum. Od roku 2009, wraz ze studentami Studenckiego Koła „Bio-MIK”, wielokrotnie brałam udział w Festiwalach Nauki, Sztuki i Techniki oraz w roku 2010 w Pikniku Naukowym.



Sylwia Różalska