



dr hab. inż. Magdalena Klimek-Ochab
Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny
Politechnika Wroclawska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław
tel. +48 71 - 320 28 16
e-mail: magdalena.klimek-ochab@pwr.edu.pl



Wrocław 27.06.17

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Damiana Drzyzgi,
zatytułowanej**

„Katalizowane przez cyjanobakterie przemiany stosowanych przemysłowo fosfonowych kompleksonów jonów metali”

Praca doktorska Pana mgr Damiana Drzyzgi została wykonana w Katedrze Chemii Analitycznej i Ekologicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Opolskiego, pod kierunkiem naukowym dr hab. Jacka Lipoka, prof. UO, który od lat zajmuje się zagadnieniami biodegradacji fosfonowych ksenobiotyków.

Kwasy fosfonowe stanowią ważną grupę związków organicznych, ponieważ mają znaczenie aplikacyjne i są elementem procesu obiegu fosforu w środowisku. Szacuje się, że np. w środowisku morskim związki zawierające bezpośrednie wiązanie pomiędzy atomem fosforu i węgla w cząsteczce, mogą stanowić nawet do 30% ogólnych zasobów fosforu. Fosfor ze związków fosfonowych jest włączany do cyklu biogeochemicznego dzięki unikalnym zdolnościom metabolicznym różnych mikroorganizmów (pro- i eukariotycznych), pozwalającym na degradację tych związków. Paradoksalnie, wydaje się, że corocznie skala wykorzystania związków P-C przez przemysł jest większa, a co za tym idzie więcej fosfonianów trafia do środowiska, ale nie jest to w równowadze z ilością nowych doniesień naukowych na temat ich losów w tymże środowisku, na co wskazują dane literaturowe, których liczba przyrasta niezmiernie wolno. Nie ulega więc wątpliwości, że rozprawa doktorska Pana Damiana Drzyzgi dotyczy tematyki ważnej, a eksplorowanej przez zaledwie kilka grup badawczych na świecie.

W przedstawionej do recenzji rozprawie, Doktorant podjął próbę określenia wpływu kilku związków aminoalkilofosfonowych o różnej strukturze cząsteczki, na pięć różnych gatunków sinic słodkowodnych. Pan Damian badał również możliwość biodegradacji substratów fosfonowych przez wybrane cyjanobakterie. Dodatkowym, ale niezmiernie istotnym celem pracy było opracowanie odpowiednich procedur analitycznych oraz ich walidacja, co pozwoliło na określenie prawdopodobnych mechanizmów przekształceń badanych związków. Należy podkreślić, że uzyskane przez Pana Damiana Drzyzgę wyniki mają nie tylko wartość poznawczą związaną z lepszym zrozumieniem roli fosfonianów jako alternatywnego (w stosunku do fosforanów) źródła fosforu w środowisku, ale też pewien wymiar ekonomiczny związany z kontrolą procesów eutrofizacji zbiorników wodnych.

Recenzowana rozprawa ma postać książki, która liczy 190 stron. Tekst został klasycznie podzielony na rozdziały i podrozdziały, a jego układ jest zgodny z przyjętymi schematami dla dysertacji doktorskich. Dokumentację w pracy stanowi 16 tabel, 36 rysunków i 29 wykresów. W strukturę rozprawy włączono także wykaz stosowanych skrótów oraz spis aktywności naukowej Doktoranta przypadający na lata realizowania pracy badawczej. Po stronie tytułowej, zwyczajowych podziękowaniach, spisie treści oraz wykazie skrótów, Autor wprowadza czytelnika w tematykę swoich badań w rozdziale pt. *Przegląd literaturowy*, poprzedzonym krótkim *Wstępem*. Rozdział ten liczy 32 strony i został opracowany w oparciu o 163 publikacje naukowe. Został on podzielony na dwa podrozdziały, z których jeden poświęcony jest fosfonianom, natomiast przedmiotem drugiego opracowania są cyjanobakterie. W opinii Recenzentki, rozdział ten stanowi zdecydowanie naj słabszą część dysertacji i pozostawia pewien niedosyt. Co więcej, wydaje się być napisany w pośpiechu. Zbyt rozległy zakres tematyczny tej części pracy spowodował, że aby nie naruszyć właściwych proporcji rozprawy, pewne tematy zostały opracowane w sposób pobieżny. Przykładem jest podrozdział 2.1.5 zatytułowany *Przekształcenia związków fosfonowych katalizowane przez mikroorganizmy*. Tytuł sugeruje, że w tej części tekstu czytelnik znajdzie zarówno informacje o poznanych mechanizmach biodegradacji fosfonianów przez różne mikroorganizmy, w tym także eukariotyczne oraz odniesienie do licznych przecież procesów biotransformacji fosfonianów (szkoda, że nie uwzględniono pracy z 2015 roku związanej z zastosowaniem sinic właśnie, w procesach transformacji pochodnych fosfonowych – chodzi o pracę Górak M, Żymańczyk-Duda E, Green

Chemistry, 2015, 17, 4570-4578). Zdaniem Recenzentki, ograniczenie liczby poruszanych zagadnień, i zarazem bardziej gruntowne omówienie poszczególnych z nich, wpłynęłoby pozytywnie na jakość tej części pracy. Rozdział 2 napisany jest generalnie poprawnym językiem, ale zdarzają się błędy stylistyczne, literowe oraz zapożyczenia z języka angielskiego jak np. zamiast związki fosfonoorganiczne (str. 13) czy organofosfoniany (str. 15) powinno być: związki fosforoorganiczne; lepiej również w języku polskim używać określenia aldehyd fosfonoctowy zamiast fosfonoacetaldehyd (np. str 18); podobnie zresztą razi słowo wprowadzać zamiast wprowadzić (np. str. 24, 160). Dodatkowo nie znalazłam odniesienia w tekście do Rys. 7 (str. 23) oraz Rys. 13 (str. 41); jak również opisu do Rys 11.A (str. 32).

Po wstępie teoretycznym następuje rozdział 3 pt. *Cel pracy*, w którym Pan mgr Damian Drzyzga jasno precyzuje postawione cele badawcze. Należy podkreślić, że były to cele ambitne i z góry zakładały duży nakład pracy eksperymentalnej. Muszę zaznaczyć, że od tego momentu pracę do końca czyta się zupełnie inaczej niż wstęp teoretyczny i zawarty w niej materiał w części zrekompensował Recenzentce niedociągnięcia związane z częścią teoretyczną.

Kolejny fragment pracy: *Metodyka prowadzonych badań* zawiera opis zastosowanych materiałów (w tym substratów fosfonowych oraz cyjanobakterii), a także wszystkich procedur badawczych, które pozwoliły Autorowi wykonać zaplanowaną pracę eksperymentalną. Do tej części nie mam zastrzeżeń merytorycznych, a dostrzeżone tu niedociągnięcia są niewielkie. Z obowiązku Recenzentki wymienię kilka: zamiast związki aminoalkilofosfonianowe (str. 49) powinno zostać użyte albo aminoalkilofosfoniany albo związki amioalkilofosfonowe; na str. 53 zamiast „...poprzez oddzielenie trzytygodniowych kolonii przeżyciowych...” sugeruję „...poprzez oddzielnie biomasy (lub komórek bakterii) od płynu pohodowlanego...”; str.56 zamiast „...tempa rozwoju kolonii mikroorganizmów...” proponuję „...tempa rozwoju hodowli mikroorganizmów...”; zamiast określenia „wiek pokolenia” poprawniej jest używać w języku polskim terminu „czas generacji”; na str. 57 opis procedury przygotowanie próbek płynów pohodowlanych do analizy NMR wydaje się nieprecyzyjny; na str. 65 zamiast określenia „homogenizat” poprawniej będzie użyć słowa homogenat.

Na kolejnych stronach pracy Doktorant przedstawia i analizuje wyniki badań w rozdziale 5 zatytułowanym *Omówienie wyników*, który podzielony jest na części tematyczne. Są one w pełni

spójne z tematem rozprawy, a każda z nich kończy się krótkim podsumowaniem. Należy podkreślić, że rozdział ten jest szczegółowy i dobrze odzwierciedla duży wkład pracy Doktoranta w realizację zaplanowanych badań. Niektóre uzyskane rezultaty są zilustrowane rysunkami, które stanowiąc dodatkowe podsumowanie, bardzo ułatwiają analizę wyników dysertacji.

Pierwsza część badań własnych (podrozdział 5.1) dotyczyła optymalizacji procedur analitycznych wykorzystywanych w kolejnych etapach realizowanego doktoratu. To zadanie wymagało dużego zaangażowania i zostało doskonale zrealizowane. Bardzo dobrze, że zdecydowano się na równoległe stosowanie różnych metod analitycznych (NMR i HPLC) do badania przemian fosfonianów prowadzonych przez fotobiokatalizatory. Ten fragment dysertacji świadczy o dobrym przygotowaniu Pana mgr Drzyzgi do zagadnień, z którymi przyszło Mu się mierzyć w późniejszej pracy badawczej oraz o przemyślanym i racjonalnie zaprojektowanym planie badawczym. Nie bez znaczenia jest również fakt, że każda metoda poddawana była procedurze walidacji. Tak systematyczne podejście do tej „technicznej” strony pracy pozwoliło na uzyskanie wielu bardzo wartościowych, powtarzalnych rezultatów badań na aktywnością sinic względem fosfonianów.

Kolejny podrozdział dysertacji (5.2) zawiera opis badań procesu biodegradacji/biotransformacji poszczególnych substratów fosfonowych przez modelowe fotobiokatalizatory. W tym rozdziale Doktorant udowodnił, że badane gatunki słodkowodnych sinic posiadają system enzymatyczny aktywny wobec badanych związków (nawet tych o rozbudowanej strukturze cząsteczki) i wykazał, że ważnym czynnikiem, który determinuje zarówno kierunek tych przemian jak i ich efektywność jest stężenie substratu. Ponieważ w każdym przypadku Pan mgr Drzyzga wskazuje konkretne produkty przemian fosfonianów, można wnioskować o mechanizmach omawianych przemian. Zaskakujący jest fakt, że wzrost liczby motywów metylenofosfonowych sprzyja procesom transformacji związków przez cyjanobakterie. Warto by było potwierdzić dodatkowo tę hipotezę kontynuując badania na większej liczbie gatunków sinic. W opinii Recenzentki, na szczególną uwagę zasługują te rezultaty, które dotyczą procesów biodegradacji związków fosfonowych, zachodzących w obecności fosforanu nieorganicznego w środowisku hodowlanym. Zazwyczaj takie właśnie warunki są zbliżone do naturalnych. Uwagi dotyczące tego rozdziału znajdują się poniżej:

- w bieżącym rozdziale (np. str.80 zdanie: *Reakcję pięciu badanych gatunków słodkowodnych cyjanobakterii na obecność ksenobiotyków odniesiono do rozwoju kolonii eksperymentalnych w oparciu o ...*) i w kilku innych miejscach w pracy użyte jest określenie „kolonia” w nieprawidłowym kontekście. W mikrobiologii słowo „kolonia” używane jest do określenia populacji mikroorganizmów wywodzącej się od jednej komórki (czyli klon) i można kolonie obserwować na podłożach stałych przy odpowiednio zastosowanej technice posiewu. W odniesieniu do sinic słowa „kolonia” można także użyć aby określić skupiska w jakich żyją niektóre gatunki – ale badania Pana Damiana nie dotyczą wpływu substratów na tworzenie skupisk. Wg powyższego, sugeruję w omawianym fragmencie zastąpić słowo „kolonia” określeniem hodowla. Analogiczna zmiana odnosi się także do pozostałych przypadków (np. str. 87, 107, 108, 147);
- kwestia nomenklatury chemicznej glifozatu – w pracy, generalnie, Doktorant wykazuje konsekwencję w nazywaniu badanych substratów fosfonowych. Nie podejmuję się dyskusowania szczegółów tejże, bowiem nawet wśród Autorytetów chemii fosforu brak jest pełnej zgody w tym obszarze nomenklatury związków organicznych. Niemniej jednak, należy podkreślić, że stosowane nazewnictwo jest zgodne z nowymi wytycznymi IUPAC. W odniesieniu do herbicydu używana jest więc nazwa *N*-(fosfonometyleno)glicyna. Tej konsekwencji brakuje w omawianym rozdziale, gdzie pojawia się nazwa *N*-(fosfonometylo)glicyna co najmniej dwa razy;
- str. 82: powinno być”.....jako użytecznego źródła fosforu....” zamiast „.....jako źródła użytecznego fosforu”;
- fragment, który zaczyna zdanie „Śledząc przemiany herbicydu w czasie 14 dni obecności w kulturach sinic...” wymaga odniesienia do konkretnego rysunku lub wykresu obrazującego kinetykę rozkładu substratu;
- str. 92 – czy uzyskane wyniki, zobrazowane na Wykresie 8 pozwalają na użycie określenia „pełna witalność” w odniesieniu do przemian HDTMP w kulturach sinicowych?

Kolejna część badań dotyczy glifozatu i analizy dynamiki przemian tego fosfonianu w kulturach cyjanobakterii. Uzyskane przez Doktoranta rezultaty jasno wskazują, że obecność fosforanu nieorganicznego wpływa pozytywnie na tempo degradacji fosfonowego substratu. Jest

to bardzo interesujące, ponieważ dotychczasowe badania nad degradacją fosfonianów pokazały, że niezwykle trudno jest pozyskać mikroorganizmy (pro- czy eukariotyczne) zdolne do biodegradacji PMG w obecności nawet niewielkich stężeń P_i . Pokazuje to unikalny profil metaboliczny fotobiokatalizatorów i potwierdza kolejny raz słuszny wybór takiego właśnie modelu badawczego. Do omawianego rozdziału, mam tylko jedną uwagę, a dotyczy ona Wykresu 13, kolumny prawej – w mojej opinii zobrazowanie zmian stężenia substratu fosfonowego w hodowlach sinic, w wybrany przez Doktoranta sposób bardzo utrudnia analizę wyników i jest nieczytelne.

Aby lepiej zbadać wpływ fosfonianów na metabolizm sinic, Doktorant w kolejnych etapach badań sprawdzał jak zmienia się, w odpowiedzi na obecność ksenobiotyków w środowisku hodowlanym, status energetyczny komórek (Rozdział 5.4) oraz zawartość specyficznych barwników w komórkach modelowych cyjanobakterii (Rozdział 5.6). Szczególnie pierwszy aspekt badań był ciekawy i nowatorski w odniesieniu do zagadnienia biodegradacji fosfonianów. W literaturze przedmiotu brak jest praktycznie danych dotyczących takiego zagadnienia. Zadanie jakie postawił sobie Pan mgr Drzyzga nie było łatwe i wymagało dużego nakładu pracy. Ważny był dobór i optymalizacja metody analizy chromatograficznej nukleotydów adeninowych, ale przede wszystkim opracowanie efektywnej procedury ekstrakcji badanych związków z komórek sinic. Uzyskane w tej części wyniki nie pozwoliły wprowadzić na ustalenie prostych zależności pomiędzy strukturą badanego substratu fosfonowego a statusem energetycznym komórki, ale wykazały, że w obecności fosfonianów wzrasta udział przemian anabolicznych w metabolizmie sinic. Doktorant otrzymał także interesujące wyniki potwierdzające wpływ fosfonianów na produkcję barwnych metabolitów przez badane szczepy sinic. W opinii Recenzentki, te rozdziały pracy (5.4 i 5.6) powinny być przedstawione kolejno po sobie, a uzyskane wyniki przedyskutowane łącznie w sposób bardziej wnikliwy z uwzględnieniem specyfiki metabolizmu badanych fotoautotrofów.

Potencjał enzymatyczny cyjanobakterii względem fosfonianów znalazł potwierdzenie także w ostatniej części badań, które polegały na wykorzystaniu techniki NMR do monitorowania procesów przekształceń DTPMP zachodzących w wyniku kontaktu substratu z ekstraktem bezkomórkowym sinic. Uzyskane w tej części wyniki pozwoliły na zaproponowanie hipotetycznych ścieżek przekształceń fosfonowego substratu w oparciu o zidentyfikowane

produkty pośrednie badanych biotransformacji. Bardzo dobrym pomysłem było opracowanie czytelnych rysunków/schematów podsumowujących otrzymane wyniki.

W kolejnym fragmencie dysertacji, który jest zatytułowany *Przemiany aminofosfonowych kompleksonów jonów metali katalizowane przez sinice – Podsumowanie*, Doktorant zestawia najważniejsze wyniki wykonanych badań w odniesieniu do poszczególnych substratów i kolejny raz, obok tekstu, posługuje się rysunkami aby ułatwić czytelnikowi zrozumienie poszczególnych aspektów badań i uzasadnić wyciągnięte wnioski. Te z kolei zostały zebrane oddzielnie w 7 rozdziale, który posiada również wersję angielską stanowiącą rozdział 8.

Dysertację kończy część literaturowa obejmująca 210 pozycji. W tej części można znaleźć drobne błędy edytorskie, które wymieniam z obowiązku Recenzentki np. czasem Autor stosuje skróty nazw czasopism, a czasami ich całe nazwy itp.

Wartości dysertacji nie obniżają błędy stylistyczne czy gramatyczne, które pojawiają się w pracy, a których nie będę wymieniała. Sygnalizowane w recenzji niedociągnięcia, sugestie i drobne pomyłki nie wpływają istotnie na merytoryczną wartość pracy. Przedstawioną mi do oceny pracę oceniam wysoko, tym bardziej, że zawarte w niej wyniki zostały opublikowane w 2 pracach oryginalnych, a 3 prace są recenzowane w czasopismach ze znaczącym współczynnikiem oddziaływania i nie mam wątpliwości, że w dniu obrony liczba prac przyjętych do druku będzie większa niż 2. Aktywność naukową oraz jakość uzyskanych wyników, potwierdzają także informacje o czynnym uczestnictwie Doktoranta w konferencjach naukowych o krajowym i zagranicznym zasięgu.

Rozprawa spełnia wymagania określone w Art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dn. 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami. **Wnoszę o dopuszczenie przez Wysoką Radę Naukową Wydziału Chemii Uniwersytetu Opolskiego jej Autora do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, zakres przedstawionego materiału doświadczalnego oraz dorobek naukowy Autora, wnoszę do Rady Wydziału o wyróżnienie przewodu doktorskiego Pana mgr. Damiana Drzyzgi.**

