



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

dr hab. Katarzyna Sułkowska-Ziaja

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr farm. Agaty Sośnickiej

**"BADANIE ZDOLNOŚCI GRZYBA GATUNKU *ARMILLARIA MELLEA*
DO ROZKŁADU TOKSYCZNYCH KSENOBIOTYKÓW"**

**wykonanej w Katedrze Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej
na Wydziale Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego**

*Podstawą formalną przygotowania recenzji jest pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego prof. dr hab. Grzegorza Nałęcza-Jaweckiego z dn. 8 czerwca 2022 z prośbą o objęcie obowiązków recenzenta rozprawy doktorskiej mgr farm. Agaty Sośnickiej na temat: „Badanie zdolności grzyba gatunku *Armillaria mellea* do rozkładu toksycznych ksenobiotyków”.*

Rozprawa doktorska została opracowana pod kierunkiem Pani Promotor prof. dr hab. Jadwigi Turło.

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej
ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, tel. +48 12 620 54 30
www.farmacja.cm.uj.edu.pl

Celowość podjętej tematyki badawczej

Obecność zanieczyszczeń w postaci leków i ich metabolitów w środowisku naturalnym stanowi poważne zagrożenie dla organizmów, dla których jest siedliskiem oraz pośrednio dla ludzi. Część farmaceutyków charakteryzuje się dużą opornością na konwencjonalne metody utylizacji np. fotodegradację czy ozonowanie, dlatego poszukiwanie skuteczniejszych metod neutralizacji zanieczyszczeń farmaceutycznych stanowi wyzwanie dla nauki XXI wieku.

Nieefektywne metody fizykochemiczne neutralizowania zanieczyszczeń farmaceutycznych są przyczyną poszukiwania nowych narzędzi, w tym rozwiązań z udziałem organizmów żywych. Interesującą alternatywą dla obecnie stosowanych metod fizykochemicznych jest bioremediacja z wykorzystaniem organizmów grzybowych. Grzyby posiadają zdolność do degradacji zanieczyszczeń dzięki enzymom, obecnym w strzępkach oraz wydzielanym do środowiska. Organizmy te dekontaminują zanieczyszczenia na drodze biodegradacji, biosorpcji i biokonwersji. Głównymi enzymami biorącymi udział w rozkładzie ksenobiotyków są: peroksydaza ligninowa, peroksydaza manganozależna czy lakaza posiadające zdolność rozkładu m.in. difenoli, aryloamin, aminofenoli. Dzięki obecności enzymów lignolitycznych, czy też związków bogatych w reszty sulfhydrylowe w ścianie komórkowej, grzyby są zdolne do biotransformacji ksenobiotyków do postaci niezagrażającej środowisku, a w przypadku metali ciężkich, do akumulacji i zamknięcia w postaci specyficznych połączeń. Ich duża skuteczność jest również spowodowana szybkim wzrostem strzępek, produkcją dużej ilości biomasy i powszechnym występowaniem w środowisku.

Rozprawa doktorska Pani mgr farm Agaty Sośnickiej znakomicie wpisuje się w jeden z priorytetowych nurtów badań XXI wieku, jakim jest opracowanie skutecznych strategii przeciwdziałania zanieczyszczeniu środowiska.

Głównym celem rozprawy doktorskiej było udowodnienie zdolności biodegradacyjnych zanieczyszczeń lekowych obecnych w środowisku wodnym wykorzystując narzędzie biotechnologiczne jakim są kultury mycelialne grzybów wielkoowocnikowych. Obiektem badań był popularny gatunek grzyba jadalnego *Armillaria mellea* (opieńka miodowa).

Ponadto Autorka przeprowadziła proces optymalizacji alternatywnego niskokosztowego podłoża hodowlanego dla organizmu grzybowego, co pozwoliłoby w przyszłości na przeskalowanie procesu oraz zaprojektowanie odpowiedniego typu bioreaktora do procesu usuwania zanieczyszczeń lekowych z wody.

Wobec powyższego, uważam za niezmiernie celowe i uzasadnione prowadzenie badań naukowych zajmujących się tą tematyką. Praca doktorska Pani mgr Agaty Sośnickiej została wykonana w zespole badawczym Pani prof. dr hab. Jadwigi Turło zajmującej się od wielu lat

problematyką biotechnologii grzybów wielkoowocnikowych i stanowi kontynuację tej tematyki badawczej, co dodatkowo gwarantuje bardzo wysoki poziom merytoryczny i celowość podjętych badań.

Charakterystyka rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska Pani mgr Agaty Sośnickiej obejmuje 132 strony maszynopisu i zawiera kolejno takie elementy jak: spis treści, wykaz skrótów, część teoretyczną – na którą składają się wprowadzenie oraz cel pracy. Na część eksperymentalną składają się 3 odrębne rozdziały. Kolejne elementy rozprawy to dyskusja, podsumowanie, wnioski, obszerna bibliografia zawierająca 193 pozycje piśmiennictwa naukowego oraz źródła internetowe, a także spisy użytych grafik oraz streszczenie w języku polskim i angielskim.

Przedstawiona do recenzji praca posiada rzeczowo opracowaną część teoretyczną. Na 30 stronach tekstu Autorka przedstawiła w zwięzły sposób problematykę zanieczyszczenia środowiska toksycznymi ksenobiotykami, w przejrzysty sposób scharakteryzowała źródła i losy farmaceutyków w środowisku oraz opisała próby przeciwdziałania temu zjawisku. W tej części Autorka scharakteryzowała również obiekt badań jakim jest gatunek grzyba z gromady Basidiomycota *Armillaria mellea* – opieńka miodowa. Część teoretyczna stanowi doskonałe wprowadzenie do badań własnych Autorki.

Na część eksperymentalną składają się trzy odrębne rozdziały. Pierwszy z nich stanowi opis pasażowania kultur mycelialnych, w celu namnożenia biomasy do dalszych etapów badań. Dwa następne rozdziały stanowiące metodologicznie zamknięte obszary zawierają osobno ujętą metodykę oraz omówienie wniosków. Nie jest to typowy układ dla rozpraw doktorskich, ale taka struktura nadaje rozprawie logiczny ciąg i ułatwia zapoznanie się z uzyskanymi wynikami. Autorka rozprawy w rozdziale „Cel pracy” rzeczowo uzasadnia ten zabieg. W rozdziale drugim części eksperymentalnej Autorka opisała badania własne dotyczące zdolności degradacyjnych szerokiego wachlarza farmaceutyków reprezentujących zróżnicowane grupy terapeutyczne. Dodatkowo Pani Doktorantka podjęła próbę oznaczenia aktywności enzymatycznej lakazy na zastosowanym podłożu komercyjnym w obecności ksenobiotyków oraz dokonała identyfikacji produktów degradacji wykorzystanych związków. Rozdział 3 dotyczy optymalizacji składu podłoża hodowlanego z wykorzystaniem niskokosztowych substratów – gdzie Pani Doktorantka przetestowała aż 77 wariantów podłoży hodowlanych wykorzystując 18 różnych substratów. Ponadto w ramach pracy określono matematyczną zależność między intensywnością wzrostu biomasy a stężeniem substratu.

Zastosowana metodyka oraz jej przedstawienie nie budzi zastrzeżeń. Szczegółowy opis wyników badań własnych wzbogacony jest o bardzo dobrą dyskusję świadczącą o znacznym doświadczeniu w pracy naukowo-badawczej i o naukowej dojrzałości Autorki.

Niniejsza dysertacja przedstawia szereg badań, przeprowadzonych w celu sprawdzenia możliwości wykorzystania powszechnie występującego i łatwego w hodowli gatunku grzyba *Armillaria mellea* w procesie mykoremediacji w skali laboratoryjnej. Jednocześnie badania zaprojektowano w taki sposób, aby ich wyniki mogły posłużyć do stopniowego powiększania skali procesu technologicznego i opracowania skutecznej metody oczyszczania ścieków z trudno degradowalnych zanieczyszczeń jakimi są ksenobiotyki.

W pracy zawarto liczne elementy świadczące o nowatorskim charakterze przeprowadzonych badań:

- po raz pierwszy do badań wykorzystano gatunek *Armillaria mellea*, jest to zatem pierwsza praca opisująca degradację wybranych leków przez kultury mycelialne tego gatunku,
- po raz pierwszy przedstawiono wyniki dotyczące profilu degradacji przez gatunek należący do grupy grzybów białej zgnilizny (ang. white rot fungi) WRF takich związków jak azytromycyna, moklobemid i telmisartan,
- po raz pierwszy przeprowadzono optymalizację składu podłoża hodowlanego dla gatunku grzyba białej zgnilizny uwzględniając aż 77 różnych wariantów podłoży hodowlanych,
- po raz pierwszy podjęto próbę określenia i opisanie modelu wzrostu dla gatunku z grupy grzybów białej zgnilizny.

Doktorantka udowodniła, iż wybrany obiekt badań – opieńka miodowa posiada zdolność degradacji farmaceutyków pochodzących z różnych grup terapeutycznych. W wyniku przeprowadzonych analiz Autorka udowodniła, że z największą efektywnością rozłożone zostały sartany oraz także sulfametoksazol, niezależnie od zastosowanego stężenia.

W trakcie optymalizacji składu podłoża hodowlanego Autorka wykazała, iż opieńka miodowa do wzrostu preferuje substraty pochodzenia rolno - spożywczego. Związki te są z reguły bogatsze w substancje odżywcze niż standardowe substraty wykorzystywane do hodowli grzybów i innych mikroorganizmów, w związku z czym uzyskanie lepszych wyników dla wariantów podłoży zawierających właśnie te składniki wydaje się być uzasadnione.

Ta część wyników została opublikowana w kwietniu 2022 roku w czasopiśmie *Water* (IF=3.103, MEN=100 pkt) w pracy: Sośnicka, A.; Kózka, B.; Makarova, K.; Giebułtowicz, J.; Klimaszewska, M.; Turło, J. Optimization of White-Rot Fungi Mycelial Culture Components for Bioremediation of Pharmaceutical-Derived Pollutants. *Water* 2022, 14, 1374. <https://doi.org/10.3390/w14091374>

Przedstawione w niniejszej publikacji badania nad optymalizacją wzrostu grzybni na produktach ubocznych pochodzenia rolno-spożywczego są ważnym krokiem na drodze do opracowania wydajnej metody, która mogłaby być w przyszłości stosowana w technologiach oczyszczania ścieków.

Wyniki uzyskane podczas realizacji pracy doktorskiej stanowią doskonały punkt wyjścia do opracowania celów badawczych jako kontynuacji badań, które w dalszej perspektywie powinny skupiać się na:

- rozszerzeniu interwału czasowego badania degradacji farmaceutyków przez *A. mellea* do minimum 8 dni,
- wyznaczeniu krzywych wzrostu dla wybranych najlepszych podłoży hodowlanych w obecności ksenobiotyku,
- zbadaniu aktywności enzymatycznej *A. mellea* w wybranych najlepszych podłożach testowych, w obecności ksenobiotyków,
- przeprowadzeniu testu toksyczności czystych podłoży hodowlanych, jak i pohodowlanych.

Nie mam żadnych uwag krytycznych, co do sposobu zaplanowania i przeprowadzenia badań oraz zaprezentowania uzyskanych wyników.

Rozprawa doktorska została przygotowana w sposób staranny, prezentuje wysoki poziom merytoryczny, jest przejrzysta w swojej formie, napisana poprawnym językiem i znajdujemy w niej wszystkie niezbędne informacje pozwalające ocenić dokonania i umiejętności Doktorantki.

W tym miejscu nasuwają się następujące pytania/uwagi do dyskusji podczas obrony pracy doktorskiej:

- *Według jakiego systemu klasyfikacji przytoczono stanowisko systematyczne *Armillaria mellea* ?*
- *Z uwagi, że opieńka miodowa traktowana jest jako tzw. gatunek zbiorowy czy próbowano potwierdzić przynależność gatunkową obiektu rozprawy badaniami genetycznymi np. poprzez uzyskanie sekwencji nukleotydowej regionu ITS (internal transcribed spacer)?*
- *Czy określenie „do testu przygotowano łącznie 10 hodowli” – odpowiada 10 kolbom hodowlanym czy serii hodowlanej?*

Podsumowanie

Podsumowując należy stwierdzić, że Autorka rozprawy zrealizowała wszystkie założone cele wykorzystując właściwe narzędzia metodologiczne, analityczne oraz statystyczne.

Chciałabym szczególnie podkreślić, że uzyskane przez mgr farm. Agatę Sośnicką rezultaty mają bardzo duże znaczenie dla nauki, są wartościowe, zawierają element nowości, posiadają charakter użyteczny i potencjalnie mogą zostać wykorzystane w bioremediacji inżynierskiej.

W mojej opinii przedłożona do recenzji praca zatytułowana: „BADANIE ZDOLNOŚCI GRZYBA GATUNKU ARMILLARIA MELLEA DO ROZKŁADU TOKSYCZNYCH KSENOBIOTYKÓW” spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim w związku z ubieganiem się o stopień doktora nauk farmaceutycznych.

Wnioskuje o dopuszczenie Pani mgr farm Agaty Sośnickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej z uwagi na jej wysoki poziom naukowy, walory poznawcze i aplikacyjne, a także na znaczenie uzyskanych wyników.

Kraków 20.08.2022

Katarzyna Surmańska - Ziąbe