



UNIwersytet
WARszawski

Wydział Chemii



Warszawa, 02.06.2022r.

dr hab. Dorota Matyszewska
Wydział Chemii,
Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych,
Uniwersytet Warszawski
ul. Żwirki i Wigury 101
02-089 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anety Wójcik

„Studies of the effect of persistent organic pollutants on the model biomembranes of soil decomposers”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Anety Wójcik dotyczy badania wpływu głównych rodzajów trwałych zanieczyszczeń organicznych na błony komórkowe bakterii oraz grzybów glebowych. Praca została przygotowana w Zespole Fizykochemicznych Badań Środowiskowych w Zakładzie Chemii Środowiska pod kierunkiem dr hab. Marcina Broniatowskiego, prof. UJ.

Tematyka podjęta w ramach przygotowywania rozprawy doktorskiej jest niezwykle aktualna. Pomimo wielu ograniczeń w stosowaniu trwałych zanieczyszczeń organicznych (TZO) w różnych gałęziach przemysłu, wprowadzonych licznymi aktami prawnymi już wiele lat temu, związki te ze względu na swoją relatywnie wysoką trwałość są ciągle obecne i wykrywane w nawet najdalszych zakątkach naszego globu. Ich długie czasy półtrwania prowadzą do bioakumulacji i biomagnifikacji w łańcuchu pokarmowym. Jednym z istotnych problemów związanych z trwałymi zanieczyszczeniami organicznymi jest skażenie gleb, które może być eliminowane lub zmniejszane dzięki wykorzystaniu mikroorganizmów takich jak bakterie czy grzyby zdolne do rozkładania tego typu zanieczyszczeń do mniej toksycznych substancji. Z tego względu fizykochemiczne badanie oddziaływania TZO z modelowymi błonami fosfolipidowymi o składzie typowym dla mikroorganizmów mogących znaleźć zastosowanie w bioremediacji jest istotne, a uzyskane wnioski mogą mieć potencjalne

znaczenie dla jeszcze lepszego doboru odpowiednich mikroorganizmów w celu zwiększenia wydajności procesu oczyszczania gleb.

Struktura rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska mgr Anety Wójcik napisana jest w języku angielskim i została przygotowana w formie spójnego tematycznie zbioru 6 artykułów naukowych opublikowanych w latach 2018-2020 w renomowanych czasopismach naukowych: *Journal of Molecular Liquids, Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* oraz *Journal of Physical Chemistry B* o łącznym współczynniku IF powyżej 25. Tematyka wszystkich prac związana jest z oddziaływaniem trwałych zanieczyszczeń organicznych z modelowymi błonami fosfolipidowymi o składzie typowym dla błon bakterii i grzybów.

Opis artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej poprzedzony jest streszczeniem w języku polskim i angielskim, w którym Autorka podaje cel swojej pracy oraz krótko podsumowuje najważniejsze wnioski wyciągnięte z prowadzonych badań. Na kolejnych stronach przedstawiony jest wstęp (ang. *Introduction*, 13 stron), w którym Doktorantka wyjaśnia definicję oraz określa cechy trwałych zanieczyszczeń organicznych, opisuje przyczyny ich obecności w środowisku, a także podaje rys historyczny dotyczący najważniejszych aktów prawnych regulujących produkcję oraz zastosowanie tego typu związków. Opisuje także pokrótce budowę błon komórkowych ze szczególnym uwzględnieniem błon bakterii i grzybów wykorzystywanych w procesach szeroko pojętej biodegradacji trwałych zanieczyszczeń organicznych w glebach. Następny rozdział (ang. *Thesis objectives*) definiuje cel pracy, którym jest zbadanie oddziaływania wybranych przedstawicieli trzech głównych grup trwałych zanieczyszczeń organicznych z modelowymi błonami lipidowymi o składzie typowym dla bakterii i grzybów mogących znaleźć zastosowanie w procesie bioaugmentacji. Doktorantka bardzo precyzyjnie określa złożoność problemu: z jednej strony zanieczyszczenia muszą przeniknąć przez barierę błon bakteryjnych tak, aby ich rozkład był możliwy. Z drugiej jednak strony, oddziaływania z substancjami organicznymi nie mogą prowadzić do zniszczenia funkcjonalności błony bakterii oraz grzybów, skutkującego śmiercią tych mikroorganizmów. Z tego względu tak istotne jest dokładne

poznanie mechanizmów oddziaływania zanieczyszczeń organicznych z modelowymi błonami lipidowymi o składzie typowym dla tych mikroorganizmów. W kolejnym rozdziale rozprawy (ang. *Short characterization of the applied experimental techniques*, 7 stron) przedstawiony został krótki opis technik wykorzystywanych w trakcie pracy eksperymentalnej: techniki Langmuira, mikroskopii kąta Brewstera, metody dyfrakcji promieniowania X (ang. grazing incidence X ray diffraction, GIXD), a także spektroskopii odbiciowej w podczerwieni z modulacją polaryzacji (ang. polarization modulation infrared reflection absorption spectroscopy, PM-IRRAS). Rozdział ten jest napisany poprawnie, ale w mojej opinii nieco zbyt skrótowo. Jako przykład hasłowego podejścia do opisywanych technik można podać zdanie dotyczące techniki PM-IRRAS, umieszczone na stronie 33 na początku podrozdziału opisującego tę technikę: „*The PM-IRRAS technique enables to obtain IR spectra directly from the Langmuir monolayer spread at the aqueous solution/air interface and specifically gives information on the orientation of the functional groups' transition moments within the monolayer*”. Niestety, w dalszej części tego podrozdziału nie umieszczono żadnych bardziej szczegółowych informacji np. na temat typowych pasm obserwowanych dla monowarstw fosfolipidowych, interpretacji ich położenia w odniesieniu do konformacji czy orientacji cząsteczek fosfolipidów w monowarstwie, czy też informacji na temat tego, jakiego rodzaju zmian w widmie uzyskanym dla monowarstw fosfolipidowych możemy się spodziewać w wyniku oddziaływań z innymi substancjami i co te zmiany mogą oznaczać w odniesieniu do mechanizmów tego typu oddziaływań. Podobną uwagę można również odnieść np. do opisu metody GIXD – jakiego rodzaju informacje na temat struktury monowarstwy uzyskujemy i jakiego rodzaju zmiany w wyniku oddziaływań z innymi substancjami można obserwować? Oczywiście, tego typu bardziej szczegółowe dane można znaleźć w licznych pracach przeglądowych, w tym również w tych właściwie cytowanych w niniejszej rozprawie. Niemniej jednak, w mojej opinii ta część rozprawy doktorskiej zdecydowanie zyskałaby, gdyby Autorka umieściła w niej nieco więcej szczegółów na temat praktycznej interpretacji wyników uzyskanych opisywanymi metodami, z której zresztą sama dalej korzysta przy omawianiu rezultatów własnych badań dotyczących wpływu zanieczyszczeń na modelowe błony fosfolipidowe.

Ostatnia, najobszerniejsza część rozprawy doktorskiej (ang. *Summary of the articles*, 40 stron), po której następuje rozdział podsumowujący (ang. *Final conclusions*, 3 strony) to syntetyczny opis najważniejszych osiągnięć prezentowanych w sześciu pracach tworzących spójny tematycznie zbiór artykułów naukowych, które zostały pogrupowane tak, aby zaprezentować oddziaływania trzech wybranych grup trwałych zanieczyszczeń organicznych: związków perfluorowanych, polichlorowanych pestycydów oraz polichlorowanych bifenyli. Prace stanowiące podstawę rozprawy zostały już opublikowane, a więc przeszły etap recenzji i spełniły wymogi zarówno merytoryczne, jak i językowe oraz edytorskie, które są stawiane pracom naukowym w renomowanych czasopismach międzynarodowych, co znacząco ułatwia proces recenzji niniejszej rozprawy. W związku z tym pozwolę sobie jedynie wymienić najważniejsze w mojej opinii osiągnięcia Doktorantki, opisane w pracach oraz syntetycznie i ciekawie przedstawione w podsumowaniu zawartym w rozdziale 4 rozprawy.

Na podstawie przeprowadzonych badań, w których mgr Aneta Wójcik wykorzystała monowarstwy fosfolipidowe jako proste modele błon komórek bakteryjnych i grzybów, stosując zarówno warstwy jednoskładnikowe, jak i wieloskładnikowe o składzie typowym dla różnego rodzaju mikroorganizmów, Autorka stwierdziła, że oddziaływania trwałych zanieczyszczeń organicznych z modelowymi błonami zależą od składu i charakteru samej błony, w tym od stosunku molowego stosowanej mieszaniny lipidowej. Ciekawa jest obserwacja dotycząca roli kardiolipiny, która okazuje się być składnikiem najbardziej odpornym na działanie badanych trwałych zanieczyszczeń organicznych. Na tej podstawie Doktorantka wnioskuje, że bakterie gram dodatnie, które w swoich błonach zawierają najwięcej kardiolipiny, wydają się być najodpowiedniejszymi mikroorganizmami do zastosowania w bioremediacji. Ponadto, Autorka słusznie zauważa, że oddziaływania zanieczyszczeń z warstwami lipidowymi zależą oczywiście także od struktury poszczególnych związków stanowiących zanieczyszczenia, a nie tylko od ich hydrofobowości. Na podstawie przeprowadzonych badań mgr Aneta Wójcik stwierdza, że oddziaływania te mogą być znacząco różne nawet w przypadku izomerów różniących się jedynie odmiennym położeniem atomów chloru w pierścieniu organicznym, jak pokazano na przykładzie polichlorowanych

bifenyli (PCB 52 oraz PCB 77) w pracy nr 5. Kontynuując ten wątek, Doktorantka pokazała także, że mechanizm oddziaływania związków o podobnej masie i zawartości atomów chloru może być zupełnie inny – dzięki wykorzystaniu różnorodnych technik eksperymentalnych ustalono, że zanieczyszczenia mogą tworzyć warstwy adsorpcyjne (np. heksachlorobenzen) lub agregaty (polichlorowane bifenyly). Ciekawa jest też konkluzja dotycząca toksyczności związków i ich pochodnych. Na przykładzie polichlorowanych pestycydów pokazano, że hydrofobowe, nieoddziałujące z membranami w sposób istotny zanieczyszczenie organiczne może być mniej toksyczne niż jego polarny metabolit (artykuł 3 i 4). Wyjątkowo ciekawe jest także porównanie wyników badań przeprowadzonych dla prostych modeli błon lipidowych tworzonych na granicy faz woda-powietrze z dostępnymi w literaturze danymi dotyczącymi badań *in vitro* przeprowadzanymi dla różnych kultur bakteryjnych, co zostało opisane w publikacji nr 6. Uzyskanie podobnych wniosków co do oddziaływania polichlorowanych bifenoli potwierdza zasadność zastosowanych modeli błon komórkowych, które pozwalają w sposób relatywnie szybki i nieskomplikowany wstępnie zbadać oddziaływanie wybranych zanieczyszczeń z modelowymi układami. **Podsumowując, przedstawione przez mgr Anetę Wójcik wyniki uważam za bardzo wartościowe, ciekawe i wnoszące istotny wkład do dziedziny naukowej.**

Ocena strony edycyjnej i językowej pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska przygotowana została na podstawie aktualnych i odpowiednio dobranych 143 odnośników literaturowych. Napisana jest w sposób z reguły przejrzysty i spójny, choć w pracy oczywiście obecne są drobne błędy językowe, które wymieniam z recenzenckiego obowiązku: np. brak końcówki „s” w czasownikach w trzeciej osobie liczby pojedynczej lub w zaznaczeniu liczby mnogiej rzeczowników, odwrotne stosowanie wyrazów „from” i „form”. Błędy te nie utrudniają w istotnym stopniu odbioru pracy i należy je raczej tłumaczyć faktem przygotowywania pracy w języku obcym. Do nieco bardziej istotnych kwestii językowych należy natomiast nie w pełni precyzyjne określenie definicji ciśnienia powierzchniowego (str. 28), gdzie podane jest ono jako „*difference between the surface tension of pure subphase and the subphase containing a monolayer*”, co może błędnie

sugerować, że monowarstwa jest w subfazie, a nie na jej powierzchni. Poza tym na stronie 33 znajdujemy odniesienie do rysunku 6A i 6B, który w istocie jest rysunkiem 7A i 7B. Niektóre fragmenty tekstu są nieco trudniejsze w odbiorze ze względu na mnogość stosowanych skrótów (np. opis artykułu 4 na str. 58) i nie zawsze w wystarczającym stopniu pomaga ich spis umieszczony na początku pracy. Rozumiem jednak, że ich zastosowanie podyktowane było potrzebą skrócenia dosyć długich pełnych nazw związków chemicznych oraz technik. Chciałabym jednak zaznaczyć, że wszystkie wymienione powyżej drobne błędy językowe i edytorskie nie wpływają na całość i nie umniejszają pozytywnej oceny merytorycznej pracy.

Ocena wkładu Doktorantki

Wszystkie prace stanowiące podstawę niniejszej rozprawy są wieloautorskie, jednakże we wszystkich sześciu publikacjach mgr Aneta Wójcik jest pierwszym autorem, co sugeruje jej istotny wkład zarówno w część eksperymentalną, jak i powstanie samych manuskryptów. **Na podstawie załączonych oświadczeń współautorów można także z całą pewnością stwierdzić, że zakres badań prowadzonych osobiście przez Doktorantkę jest wystarczający jako podstawa do uzyskania stopnia naukowego doktora.** Z treści złożonych oświadczeń wynika, że Doktorantka wykonywała lub nadzorowała wykonywanie wszystkich eksperymentów dotyczących techniki Langmuira oraz mikroskopii kąta Brewstera, a także niektórych eksperymentów spektroskopowych. Warto również zauważyć, że mgr Aneta Wójcik jest współautorką w sumie dziesięciu publikacji naukowych, które do tej pory były cytowane 63 razy, przy czym publikacje opisywane w ramach niniejszej rozprawy były cytowane 29 razy, co potwierdza aktualną i istotną tematykę prowadzonych przez Nią badań i jednocześnie stanowi wyróżniający wynik na tym etapie rozwoju naukowego. Wszystkie prace opublikowane zostały w międzynarodowych czasopismach o wysokim zasięgu, co potwierdzone jest wysokimi wartościami współczynników IF. Prowadzone przez Doktorantkę badania były także częściowo finansowane z projektu OPUS 11, kierowanego przez Promotora.

Podsumowanie

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z ustawą z 14 marca 2003 r oraz ustawą z 3 lipca 2018r. W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgr Anety Wójcik do dalszych etapów postępowania o nadanie jej stopnia doktora nauk chemicznych. Jednocześnie ze względu na aktualność tematyki, wysoki poziom merytoryczny oraz szeroki zakres prowadzonych przez Autorkę badań, a także wyróżniający dorobek naukowy wnioskuję o wyróżnienie pracy.



dr hab. Dorota Matyszewska