

Dr Agata Justyna Święciło
Katedra Mikrobiologii Środowiskowej
Wydział Agrobiotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin

Załącznik 2

AUTOREFERAT DOTYCZĄCY DZIAŁALNOŚCI NAUKOWO-BADAWCZEJ

LUBLIN, 2019

I. IMIĘ I NAZWISKO: AGATA JUSTYNA ŚWIĘCIŁO

II. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE:

- 2002 r. stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii, specjalność biochemia uzyskałam na podstawie rozprawy doktorskiej pt.: „Fizjologiczne aspekty reakcji drożdży na stres”, wykonanej w Zakładzie Biochemii, Instytutu Nauk Rolniczych, Akademii Rolniczej w Lublinie; promotor: *prof. dr hab. T. Biliński*
- 1993 r. tytuł magistra biologii w zakresie mikrobiologii uzyskałam na podstawie pracy magisterskiej pt.: „Izolacja mutantów *Rhizobium meliloti* pochodnych szczepu F1 opornych na fagi”, wykonanej w Zakładzie Mikrobiologii, Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie; promotor: *prof. dr hab. M. Kowalski*

III. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH:

- **Adiunkt** (01.10.2002 do chwili obecnej) – (od 2002 do 2006) Zakład Biochemii, Instytut Nauk Rolniczych w Zamościu, Akademia Rolnicza w Lublinie, (od 2006 do 2015) Katedra Biochemii i Chemii Środowiskowej, Wydział Nauk Rolniczych (następnie od 2014 - Biogospodarki), Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, (od 2015 do chwili obecnej) Katedra Mikrobiologii Środowiskowej, Wydział Agrobiotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie.
- **Asystent** (01.09.1993 do 30.09.2002) Zakład Biochemii, Instytut Nauk Rolniczych w Zamościu, Akademia Rolnicza w Lublinie

DOSKONALENIE ZAWODOWE

- staż naukowy (2x3 tygodnie w 2004 i 2005 r) w Instytucie Technologicznym na Uniwersytecie Henri Poincaré, Nancy I, Francja (Université Henri Poincaré, Nancy I, Département Biologie Appliquée Agro-Alimentaire, Institut Universitaire de Technologie, France)

IV. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 r. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311)

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

Osiągnięciem, stanowiącym podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego, jest cykl siedmiu prac naukowych obejmujących sześć oryginalnych prac twórczych oraz jedną pracę przeglądową, ujętych pod wspólnym tytułem: „**Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* o zmienionej aktywności systemu antyoksydacyjnego jako mikroorganizmy testowe w ocenie toksyczności wybranych ksenobiotyków występujących w środowisku rolniczym oraz właściwości antyoksydacyjnych materiału roślinnego**”.

b) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

- O.1.** Świącilo A. 2009. Wpływ stresu oksydacyjnego na reakcje komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* na preparaty pestycydowe Betokson Super i Fusilade oraz Heteroauksynę IAA. *Zesz. Probl. Postęp. Nauk. Rol.*, z. 542, s. 549-558.
(4 pkt. MNiSW*, 13 pkt MNiSW**, udział 100%)
- O.2.** Świącilo A. 2010. Wpływ prostych związków fenolowych na procesy fizjologiczne drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. *Zesz. Probl. Postęp. Nauk. Rol.*, z. 556, cz. I, s. 483-491.
(6 pkt. MNiSW*, 13 pkt MNiSW**, udział 100%)
- O.3.** Świącilo A. Koprowska A. 2012. Oddziaływanie diuronu i trichlopyru, substancji aktywnych preparatu herbicydowego Herbitor Super 440SE na mikroorganizmy prokariotyczne i eukariotyczne. *Rocz. Nauk. Stow. Ekon. Rol. Agrobiz.* t. 14, z. 7, s. 133-138. (7 pkt. MNiSW*, 10 pkt MNiSW**, udział 90%)
- O.4.** Świącilo A. 2013. Role of monophenols in the recovery process of wild-type yeast cells exposed to severe environmental stress. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, Vol. 63, No. 3, pp. 187-191. (10 pkt. MNiSW*, 15 pkt. MNiSW**, udział 100%)
- O.5.** Świącilo A 2016. Cross-stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* yeast –new insight into an old phenomenon. *Cell stress & chaperones*, Vol. 21 Issue 2, pp. 187-200.
(20 pkt. MNiSW*; IF=2,411, IF_{5 year}=2,571, udział 100%)
- O.6.** Rybczyńska-Tkaczyka K, Świącilo A, Szychowski K.A, Kornilowicz-Kowalska T. 2018. Comparative study of eco- and cytotoxicity during biotransformation of anthraquinone dye Alizarin Blue Black B in optimized cultures of microscopic fungi. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* Vol. 147 (1), pp. 776-787.
(30 pkt. MNiSW*; IF=3,974; IF_{5 year}=4,000, udział 30%)
- O.7.** Świącilo A, Rybczyńska-Tkaczyk K, Najda A, Krzepiło A, Prażak R, Zawisłak G. 2018. Application of growth tests employing a $\Delta sod1$ mutant of *Saccharomyces cerevisiae* to study the antioxidant activity of berry fruit extracts. *LWT-Food Sci. Technol.*, Vol. 92, pp. 96-102. (40 pkt. MNiSW*; IF₂₀₁₇=3,129; IF_{5 year}=3,455, udział 70%)

* wg załączników do komunikatu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego za odpowiedni rok (wg roku opublikowania)

** wg komunikatu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 12 grudnia 2016 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych wraz z liczbą punktów przyznawanych za publikacje w tych czasopismach

Impact Factor (IF) - zgodnie z rokiem opublikowania (w przypadku publikacji z 2018 roku podano wskaźnik IF za 2017 oraz 5-letni IF)

Łącznie dla ww. cyklu publikacji:

Sumaryczna ilość punktów MNiSW –117* (141**)

Impact Factor (IF) – 9,514

Mój udział procentowy waha się od 30 do 100%, a średnio wynosi 84%.

We wszystkich publikacjach, które wchodzą w skład osiągnięcia naukowego, byłam jedyną autorką koncepcji badań obejmujących testy na drożdżach i jedynym wykonawcą analiz laboratoryjnych na tym modelu (zgodnie z Załącznikiem 4). Oświadczenia współautorów prac, określające ich indywidualny wkład w powstanie tych prac zamieszczone są w Załączniku 5.

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

W ramach prezentowanego osiągnięcia naukowego, którym jest w myśl ustawy cykl publikacji powiązanych tematycznie, przedstawiono wyniki badań naukowych dotyczących możliwości zastosowania mutantów drożdży z gatunku *Saccharomyces cerevisiae* o zmienionej aktywności systemu antyoksydacyjnego do badania toksyczności wybranych ksenobiotyków stanowiących zanieczyszczenie środowiska rolniczego oraz właściwości antyoksydacyjnych materiału roślinnego. Badania te zostały przeprowadzone i opublikowane w latach 2009-2018 i stanowią najważniejsze osiągnięcie w mojej dotychczasowej działalności naukowej.

Wprowadzenie

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* w środowisku rolniczym

Drożdże z gatunku *Saccharomyces cerevisiae* są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie. Występują one głównie w glebie, w obszarze ryzosfery oraz w ryzoplacie (na powierzchni korzeni), a także w fyllosferze, czyli na powierzchni organów nadziemnych roślin. Szczególnie licznie są one reprezentowane na łądych, liściach, kwiatach i bogatych w cukry owocach. Ich zdolność do fermentacji oraz wydzielania CO₂ była wykorzystywana już w starożytności przy produkcji wina i wypieku chleba. Obecnie na szeroką skalę stosuje się je w przemyśle spożywczym (gorzelnictwie, browarnictwie, winiarstwie, mleczarstwie, kiszarnictwie), paszowym, farmaceutycznym, kosmetycznym oraz w nowoczesnych biotechnologiach m in. w produkcji suplementów diety, enzymów, dodatków do żywności i pasz, czy etanolu z odpadów ligninocelulozowych.

Drożdże z gatunku *S. cerevisiae* należą do klasy *Hemiascomycetes*, gromady grzybów workowych *Ascomycota* w obrębie królestwa grzybów *Fungi*. Są to jednokomórkowe, eukariotyczne organizmy wolnożyjące i z tego względu są one bezpośrednio narażone na charakterystyczne dla środowisk naturalnych zmiany warunków życia. Zmiany te zarówno natury fizycznej (zmiany temperatury, natężenia promieniowania) jak i chemicznej (zmiany osmolarności, pH, dostępności substancji odżywczych, czy też niektórych ksenobiotyków) doprowadziły do wykształcenia i wyselekcjonowania specyficznych mechanizmów rozpoznawania tego typu sygnałów środowiskowych i adekwatnej odpowiedzi na nie.

Mechanizmy te umożliwiają im przystosowanie się i przetrwanie często długich okresów niesprzyjających do rozwoju, pod warunkiem jednak, że niekorzystny czynnik nie działa zbyt długo lub zbyt intensywnie. Do tego typu mechanizmów należy między innymi odporność adaptacyjna pojawiająca się w wyniku uruchomienia programu odpowiedzi na stres.

W komórkach drożdży funkcjonują mechanizmy odpowiedzi swoistej na poszczególne czynniki stresowe oraz wspólny dla wielu czynników stresowych mechanizm odpowiedzi na stres środowiskowy (environmental stress response, ESR), który bywa też określane terminem wspólnej odpowiedzi środowiskowej (common environmental response, CER) (Causton i in. 2001; Gasch i in. 2000). Odpowiedź na konkretny czynnik środowiskowy jest unikalna gdyż jest składową elementów specyficznej i środowiskowej odpowiedzi na stres.

Program odpowiedzi na stres środowiskowy (ESR) drożdży występujących w środowisku życia roślin (fyllosferze i ryzosferze) może być aktywowany nie tylko poprzez bezpośrednio działający czynnik stresowy ale także w myśl teorii ksenohormozy (Howitz i Sinkler 2008; Hooper i in. 2010) przez zmiany ilościowo-jakościowe specyficznych metabolitów roślinnych wywołane tym czynnikiem. Z dotychczasowych badań wynika, że w warunkach stresów środowiskowych rośliny wytwarzają szereg metabolitów wtórnych o różnych właściwościach takich jak: fitohormony, inne endogenne substancje regulatorowe, antyoksydanty, osmolity i fitoaleksyny. Pod względem chemicznym stanowią one zróżnicowaną grupę związków, do której należą między innymi związki fenolowe, terpenoidy i alkaloidy (Gururani i in. 2015; Ashraf i in. 2018). Metabolity fenolowe stanowiące podstawową frakcję roślinnych metabolitów wtórnych stały się obiektem moich badań.

Powszechna obecność drożdży w środowisku rolniczym oraz ich zdolność do rozpoznawania i adekwatnej odpowiedzi na pierwotne i wtórne (w formie specyficznych metabolitów roślinnych) sygnały środowiskowe, według mojej oceny, predysponuje je do wykorzystania jako biomarkerów ksenobiotyków zanieczyszczających środowisko rolnicze oraz jako detektorów specyficznych fitozwiązków w materiale roślinnym.

Agrochemikalia (głównie preparaty pestycydowe) oraz należące do grupy odpadów przemysłowych - barwniki syntetyczne są jednymi z najbardziej uciążliwych zanieczyszczeń gleby. Są to na ogół substancje aktywne biologicznie i o różnej podatności na biodegradację, co może prowadzić do ich akumulacji w środowisku. Ponadto wraz z roślinami mogą być łatwo włączane do łańcucha troficznego stanowiąc zagrożenie dla zdrowia zwierząt i człowieka. Toksyczność ksenobiotyków dla organizmów żywych zależy od wielu czynników, w tym głównie od ich natury chemicznej i bioprzyswajalności, czyli zawartości rozpuszczalnej w wodzie frakcji tych związków. W takiej formie są one dostępne dla organizmów żywych i mogą oddziaływać na ich metabolizm (Oleszczuk 2007).

Obecność ksenobiotyków w środowisku rolniczym jest związana przede wszystkim z nawożeniem i ochroną roślin. W świetle ustawy z dnia 18 grudnia 2003 r. o ochronie roślin (Dz. U. z 2004 r. nr 11, poz. 94 z późn. zm.) do środków ochrony roślin należą herbicydy oraz regulatory wzrostu i rozwoju roślin, te ostatnie określane są również terminem bioregulatorów. Preparaty, które były obiektem moich badań tj. Fusilade Forte 150 EC, Herbitor Super 440 SE i Betokson Super 025 SL zawierają różne substancje aktywne o zróżnicowanym działaniu i przeznaczeniu. Fusilade Forte 150 EC i Herbitor Super 440 SE należą do grupy herbicydów, natomiast w myśl ww. ustawy preparat Betokson Super 025 SL jest zaklasyfikowany do bioregulatorów.

Fusilade Forte 150 EC zawiera jako substancję czynną flusisfop-p-butyli (związek z grupy arylofenoksykwasów) w ilości 150 g/L. Środek ten jest przeznaczony do zwalczania

perzu właściwego oraz rocznych chwastów jednoliściennych głównie w uprawach buraka cukrowego, ziemniaka i rzepaku ozimego. Herbitor Super 440 SE (obecnie wycofany z oferty handlowej) był przeznaczony do niszczenia zbędnej roślinności w obrębie małych obiektów nieużytkowanych rolniczo. Zawierał on dwie substancje czynne diuron (związek z grupy pochodnych mocznika) w ilości 385 g/L i trichlopyr (związek z grupy pochodnych kwasu pirydynokarboksyłowego) w formie estru butoksyetyłowego w ilości 55 g/L. Betokson Super 025 SL jest preparatem zalecanym do poprawienia zawiązywania owoców oraz zwiększenia plonowania pomidora w uprawach polowych i pod osłonami. W skład tego preparatu wchodzi kwas β -naftoksyooctowy (NOA) w postaci soli z trójetanoloaminą w ilości 25 g/L środka.

NOA i trichlopyr są to substancje aktywne dwóch różnych preparatów herbicydowego oraz regulatora wzrostu roślin z grupy syntetycznych auksyn. Są to pochodne naturalnej auksyny - heteroauksyny (kwasu indolilo 3-octowego, IAA), naturalnego roślinnego fitohormonu z grupy stymulatorów. Syntetyczne auksyny w małych (fizjologicznych) stężeniach wykazują funkcje regulatorowe, generalnie stymulując wzrost i rozwój roślin. Natomiast w dużych stężeniach wykazują działanie inhibicyjne, co uzasadnia ich wykorzystanie jako efektywnych herbicydów.

Barwniki syntetyczne są wprowadzane do środowiska rolniczego na mniejszą skalę niż środki ochrony roślin, ale z racji ich wyjątkowej trwałości i różnorodności mogą one stanowić zagrożenie zarówno dla organizmów wodnych jak i roślin lądowych oraz zwierząt, w tym człowieka (Ghaly i in. 2014). Dane literaturowe potwierdziły, że mogą one wywoływać ostre efekty toksyczne, kancerogenne i mutagenne u organizmów ekspozowanych na ich działanie (Vaithanomsat i in. 2010; Zabłocka-Godlewska i Przysaś 2016).

Ich głównym źródłem są osady ściekowe, stosowane w nawożeniu roślin oraz niedostatecznie oczyszczone ścieki lub odcieki odprowadzane do wód powierzchniowych. Barwniki pochodzą z przemysłu tekstylnego, kosmetycznego, spożywczego, farmaceutycznego oraz są produktem ubocznym w produkcji papieru, farb, lakierów i tworzyw syntetycznych (Almeida i Corso 2014; Yang i in. 2016). Ładunek barwnych ksenobiotyków określany jest w skali roku na 280000 ton (Jin i in. 2007). Barwniki antrachinonowe, stanowią jedną z ważniejszych grup syntetycznych barwników wykorzystywanych głównie do barwienia włókien naturalnych takich jak wełna i jedwab (Burkishaw 1990; Mahpatra 2016). W tej grupie ważne miejsce zajmuje błękit alizaryny (Alizaryn Blue Black B; ABBB), rozpuszczalny w wodzie barwnik będący obiektem moich badań. Z uwagi na dużą skalę produkcji barwionych tkanin oraz nieskuteczność procesów technologicznych w zakresie wiązania barwnika, do środowiska może przedostać się nawet 50% jego wyjściowej ilości, co sprawia, że jego stężenie w ściekach może sięgać nawet 300 mg/mL (Khan i in. 2013). Z tego względu wielu naukowców i technologów poszukuje skutecznych, tanich i nie obciążających środowiska metod ich odzysku lub degradacji/detoksykacji. W kontekście dużej depozycji substancji barwnikowych do środowiska oraz wciąż niedostatecznej wiedzy na temat ich toksyczności niezwykle ważny jest monitoring obecności, przemian i oddziaływania tych substancji i/lub produktów ich degradacji na organizmy żywe.

Pomimo tego, że drożdże z gatunku *S. cerevisiae* nie są wykorzystywane jako organizmy modelowe w skomercjalizowanych testach toksykologicznych to w literaturze przedmiotu pojawiają się doniesienia o możliwości ich wykorzystania w badaniach zagrożeń związanych z obecnością ksenobiotyków w środowisku. Okazały się one przydatne np. do oceny charakteru oddziaływań różnych pestycydów, metali śladowych czy wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) (Ribeiro i in. 2000; Viau i in. 2006; Horii i in. 2009). Bazując na tych informacjach oraz doświadczeniu zdobytym podczas badań nad efektami biologicznymi

pyretroidów oraz preparatów pestycydowych - Basta 150 SL i Cyperkill Super 25 EC u drożdży *S. cerevisiae* podjęłam próbę oceny niespecyficznego oddziaływania substancji czynnych trzech preparatów: Fusilade Forte 150 EC, Herbitor Super 440 SE i Betokson Super 025 SL. Badaniami objęłam także heteroauksynę, będącą prekursorem substancji aktywnych dwóch z nich (NOA i trichlopyru). Pomimo dobrze poznanych, plejotropowych efektów oddziaływania na rośliny naturalnych auksyn oraz ich syntetycznych analogów, jak do tej pory zgromadzono stosunkowo mało informacji o ich wpływie na organizmy heterotroficzne.

Wyniki badań wstępnych dotyczących odpowiedzi rzodkiewki zwyczajnej (*Raphanus sativus* L.) odmiany Rowa, będącej organizmem docelowym (target organism) dla tego typu preparatów i komórek szczepu dzikiego drożdży *S. cerevisiae* potwierdziły przydatność drożdży jako modelu do badania niespecyficznego oddziaływania tych związków (Święciło 2009). Zaobserwowany w toku tych badań podobny zakres wrażliwości drożdży szczepu dzikiego na różne substancje stanowiące składniki aktywne badanych preparatów wskazywał na uniwersalny mechanizm ich niespecyficznego oddziaływania. Te wstępne doniesienia stały się punktem wyjścia do podjęcia dalszych badań mających na celu wyjaśnienie przyczyn obserwowanej reakcji drożdży na badane pestycydy. W tym celu wykorzystano szereg mutantów drożdżowych o zmienionej aktywności systemu antyoksydacyjnego, stawiając hipotezę, iż ich reakcja będzie zróżnicowana w zależności od roli poszczególnych elementów tego systemu w procesach biotransformacji tych ksenobiotyków.

Kolejnym nowatorskim podejściem w tym zakresie była próba wykorzystania drożdży do określenia zakresu toksyczności barwnika antrachinonowego, błękitu alizaryny ABBB i ewentualnie produktów jego mikrobiologicznej degradacji. Z doświadczeń wstępnych wynikało, że model ten można wykorzystać w tym celu, gdyż sam nie ma zdolności do degradacji/dekoloryzacji tego typu związków, chociaż okazał się ich skutecznym bioakumulatorem.

Pomimo podobieństw drożdży *S. cerevisiae* do wyższych eukariota w zakresie podstawowej organizacji i procesów komórkowych, posiadają one unikatowe cechy, dzięki którym można nie tylko określić poziom ich wrażliwości na badane ksenobiotyki, ale także identyfikować potencjalne mechanizmy ich oddziaływania.

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* jako organizm modelowy w badaniach biologicznych

Drożdże z gatunku *S. cerevisiae* rozmnażają się przez pączkowanie, nie posiadają wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w błonach plazmatycznych, co czyni je niepodatnymi na proces peroksydacji lipidów, są niezdolne do syntezy niektórych antyoksydantów, mają możliwość uzyskiwania energii na drodze fermentacji lub oddychania tlenowego, dzięki czemu są zdolne do życia w różnych warunkach natlenienia środowiska oraz tolerują mutacje jądrowe i mitochondrialne, które u wyższych eukariontów są letalne. Przykładem tego typu zmian genetycznych są mutacje prowadzące do obniżenia sprawności systemu antyoksydacyjnego.

Mutacja w genie jądrowym *sod1*, skutkuje brakiem aktywności cytoplazmatycznej dysmutazy ponadtlenkowej (CuZnSOD), kluczowego enzymu antyoksydacyjnego, usuwającego anionorodnik ponadtlenkowy z tego przedziału komórkowego. W optymalnych warunkach wzrostu, komórki tego mutantu nie różnią się od komórek izogenicznych szczepów dzikich. Natomiast charakteryzują się one większą wrażliwością na ekspozycje na 100% tlen oraz czynniki generujące reaktywne formy tlenu (RFT) (Lewinska i in. 2004; Wallace i in. 2005; Kwolek-Mirek i in. 2011; Sadowska-Bartosz i in. 2013). Poza tym są one bardziej wrażliwe

niż izogeniczne komórki szczepu dzikiego na warunki silnego stresu osmotycznego (Święciło i Krzepińko 2005), który oprócz symptomów specyficznych dla tego rodzaju stresu, powoduje charakterystyczne dla stresu oksydacyjnego objawy w postaci wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu RFT, spadku poziomu puli zredukowanych tioli czy zwiększonego poziomu karbonylacji białek (Garay-Arroyo i in. 2003; Koziol i in. 2005; Zyracka i in. 2005a)

Mutacja w mitochondrialnym genie *sod2* skutkuje brakiem aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD) w tym przedziale komórkowym. Komórki mutantu $\Delta sod2$ nie są aż tak wrażliwe na 100% tlen jak komórki mutantu $\Delta sod1$, gdyż mogą się w tych warunkach dzielić, ale ich podziały komórkowe przebiegają wolno, a ich potencjał replikacyjny jest w tych warunkach bardzo ograniczony (Wawryn i in. 2002)

Mutant $\Delta als1$ charakteryzuje się niskim stężeniem wewnątrzkomórkowego glutationu, który stanowi około 15% zawartości tego związku w komórkach izogenicznego szczepu dzikiego. Glutation jest ważnym nieenzymatycznym antyoksydantem obecnym w komórkach drożdży w relatywnie dużym stężeniu (Pennincks 2002). Pełni on funkcje komórkowego buforu redoks oraz uczestniczy w transformacji ksenobotyków i sygnalizacji redoks (Pennincks 2000).

Mutant $\Delta ctt1cta1$ jest pozbawiony aktywności katalazowej, enzymów usuwających nadtlenek wodoru, z cytoplazmy (katalaza T) i peroksysomów (katalaza A). Pomimo tego charakteryzują się one podobną do komórek szczepu dzikiego dynamiką wzrostu i starzenia w standardowych warunkach natlenienia. Natomiast efekty tych mutacji w warunkach hiperoksji są uzależnione od tła genetycznego wykorzystywanych w badaniach szczepów (Wawryn i in. 1999)

Na aktywność metaboliczną komórek drożdży można łatwo wpływać modyfikując skład podłoży hodowlanych oraz warunki natlenienia. Stosując odpowiednie substraty oddechowe i/lub zmieniając warunki natlenienia można uzyskać komórki o metabolizmie tlenowym lub fermentacyjnym. Obecność tlenu oraz niefermentowalnych źródeł węgla takich jak etanol i glicerol w środowisku hodowlanym prowadzi do uruchomienia szlaków oddychania tlenowego. Stosunkowo łatwo można także uzyskać komórki „niekompetentne oddechowo”, czyli niezdolne do takiego sposobu zdobywania energii (tzw. mutanty „petite” typu $\Delta rho-$). W wyniku działania mutagenu bromku etydyny uszkodzony zostaje genom mitochondrialny, co sprawia że łańcuch oddechowy nie jest kompletny i nie może być aktywny. Komórki takie można hodować (bez względu na obecność tlenu) tylko w obecności fermentowanych źródeł węgla takich jak glukoza lub fruktoza.

Niezdolność do syntezy niektórych antyoksydantów, m.in. takich jak związki fenolowe, witamina C (L-askorbinian) i E oraz łatwość z jaką drożdże pobierają je ze środowiska sprawia, że ich komórki można wykorzystać w testach komplementacyjnych do stwierdzenia prooksydacyjnego lub antyoksydacyjnego charakteru działania badanych związków. Najczęściej w tego typu testach wykorzystuje się zjawisko komplementacji defektów wzrostu komórek mutantu $\Delta sod1$. Wrażliwość komórek mutantu $\Delta sod1$ na różnego typu chemiczne prooksydanty lub czynniki generujące stres osmotyczny objawia się spowolnieniem lub całkowitym zahamowaniem wzrostu. Jeżeli defekt wzrostu mutantu $\Delta sod1$ będzie spowodowany działaniem prooksydacyjnym ksenobotyku to suplementacja podłoży wzrostowych w antyoksydanty powinna znosić ten niekorzystny efekt. Słuszność tego założenia znalazła potwierdzenie w danych literaturowych. Suplementacja podłoży w antyoksydanty tiolowe (L-cysteinę, N-acetylocysteinę, zredukowany glutation czy też ditiotreitrol) oraz askorbinian chroniła komórki tego mutantu przed szeregiem czynników ograniczających ich wzrost takich jak: alkohol allilowy (Mirek-Kwolek i in. 2009), jony kadmu (Żyracka 2014), podchloryn i chloryn sodu (Kwolek-Mirek i in. 2011),

co jednocześnie potwierdzało ich prooksydacyjny mechanizm działania w komórkach drożdży. Podobnie, znoszenie tleno - zależnej auksotrofii względem lizyny i metioniny komórek mutantu $\Delta sod1$ w obecności tego samego zestawu antyoksydantów jednoznacznie potwierdzało zależny od stresu oksydacyjnego mechanizm tego defektu metabolicznego (Żyracka i in. 2005b).

W tym samym układzie doświadczalnym można także badać właściwości antyoksydacyjne analizowanych substancji czystych lub złożonych próbek środowiskowych. W tym przypadku defekt wzrostu komórek mutantu $\Delta sod1$ indukuje się silnym stresem np. termicznym, osmotycznym, oksydacyjnym czy też cytotoksycznym działaniem innego czynnika natury chemicznej lub fizycznej. Jeśli po suplementacji podłoży wzrostowych w badane antyoksydanty lub próbki środowiskowe zawierające antyoksydanty defekty te zostaną całkowicie lub chociażby częściowo zniwelowane to będzie to wskazywać na ich potencjał antyoksydacyjny. Właściwości antyoksydacyjne oznaczone w układzie komórkowym, czyli *in vivo* mają dużą wartość poznawczą, gdyż w przeciwieństwie do stosowanych rutynowo testów biochemicznych polegających na badaniu zdolności substancji do zmiatania syntetycznego wolnego rodnika w warunkach *in vitro* wskazują na ich biodostępność oraz oddziaływanie kompleksowe na metabolizm, którego końcowym efektem jest reakcja fizjologiczna.

CEL I ZAKRES PRAC BADAWCZYCH

W przedstawionych pracach dokumentujących osiągnięcie naukowe podjęłam badania, których celem była ocena możliwości wykorzystania drożdży *S. cerevisiae* o zmienionej aktywności systemu antyoksydacyjnego do badania toksyczności wybranych ksenobiotyków ekosystemu rolniczego oraz właściwości antyoksydacyjnych materiału roślinnego. Realizacja głównego celu była możliwa dzięki sformułowaniu następujących celów szczegółowych:

1. Ocena oddziaływania substancji aktywnych preparatów pestycydowych Fusilade Forte 150 EC, Betokson Super 025 SL oraz heteroauksyny na komórki drożdży *S. cerevisiae* o różnej aktywności systemu antyoksydacyjnego w warunkach optymalnych i silnego stresu oksydacyjnego (**praca O.1**).
2. Ocena oddziaływania substancji aktywnych preparatu Herbitor Super 440 SE na drożdże *S. cerevisiae* o różnej aktywności systemu antyoksydacyjnego. Porównanie poziomu wrażliwości drożdży i bakterii na substancje aktywne tego preparatu (**praca O.3**).
3. Ocena oddziaływania barwnika alizarynowego (ABBB) oraz produktów jego mikrobiologicznej degradacji na komórki drożdży szczepu dzikiego SP4wt oraz jego izogenicznego mutantu $\Delta sod1$. Identyfikacja procesów zaangażowanych w mechanizmy toksyczności tej substancji i/lub produktów jej degradacji (**praca O.6**).
4. Identyfikacja mechanizmów komórkowych warunkujących podstawowy i adaptacyjny poziom odporności na ksenobiotyki, uruchamianych w ramach programu odpowiedzi na stres środowiskowy (**O.5**).
5. Ocena charakteru oddziaływania wybranych antyoksydantów fenolowych na komórki drożdży *S. cerevisiae* w optymalnych warunkach wzrostu oraz silnych stresów środowiskowych (**prace O.2, O.4**).
6. Ocena możliwości wykorzystania parametrów wzrostu komórek mutantu $\Delta sod1$ drożdży *S. cerevisiae* w warunkach szoku osmotycznego do oznaczania biodostępności

i właściwości antyoksydacyjnych hydrofilowych związków o właściwościach przeciwutleniających udokumentowanych metodami biochemicznymi (**praca O.7**).

7. Ocena możliwości wykorzystania parametrów wzrostu komórek mutantu $\Delta sod1$ w warunkach silnego szoku osmotycznego do oznaczania biodostępności i właściwości antyoksydacyjnych związków obecnych w próbkach materiału roślinnego (**praca O.7**).

Cel pierwszy zrealizowano porównując reakcje komórek drożdży szczepu dzikiego i mutantów o różnej sprawności systemu antyoksydacyjnego na preparaty pestycydowe: Fusilade Forte 150 EC, Betokson Super 025 SL oraz heteroauksynę w warunkach optymalnych dla ich wzrostu oraz stresu oksydacyjnego, indukowanego atmosferą 100% tlenu (**praca O.1**). W badaniach wykorzystano komórki drożdży szczepu dzikiego *wt* oraz mutantów: $\Delta sod1$, $\Delta sod1als2$, $\Delta sod2$, „petite”, $\Delta ctt1cta1$ i $\Delta als1$. Wrażliwość komórek drożdży określono na podstawie ich wzrostu w formie kropli po wysiewie serii zawiesin komórek drożdży o różnej gęstości na podłoże stałe, uzupełnione w rozcieńczenia preparatów pestycydowych oraz heteroauksyny. Taki sposób aplikacji ksenobiotyków umożliwił badanie efektów długotrwałego ich oddziaływania na metabolizm komórek drożdży.

Cel drugi zrealizowano poprzez porównanie reakcji różnych szczepów drożdży *S. cerevisiae* oraz bakterii (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus* i *Staphylococcus albus*) na substancje aktywne preparatu herbicydowego Herbitor Super 440SE (**praca O.3**). Wykorzystano dwa szczepy dzikie drożdży: SP4 oraz BY4741 oraz izogeniczne do nich mutanty: $\Delta sod1$, $\Delta ctt1cta1$, $\Delta sod1ctt1cta1$, $\Delta rho-$, $\Delta msn2,msn4$. Wrażliwość mikroorganizmów badano za pomocą zmodyfikowanej metody dyfuzyjno-krażkowej. Hodowle mikroorganizmów rozcieńczano w taki sposób aby uzyskać zawiesiny o takiej samej gęstości. Następnie wysiewano je na pożywkę YPG2% dla drożdży oraz LB dla bakterii. Preparat herbicydowy aplikowano w formie krążków bibułowych nasączonych wodnymi roztworami tego preparatu w stężeniach: niższym (1%), wyższych (10 i 15% v/v) oraz zbliżonym do zalecanego przez producenta (6%). Krążki umieszczano w odpowiednich sektorach pożywki tuż po wysiewie mikroorganizmów. Po inkubacji mierzono strefy zahamowania wzrostu wokół krążków bibułowych. Wielkość stref zahamowania wzrostu odzwierciedlała wrażliwość mikroorganizmu na substancje aktywne preparatu.

Cel trzeci został zrealizowany w wyniku przeprowadzenia testu wrażliwości komórek drożdży szczepu dzikiego SP4(*wt*) i jego izogenicznego mutantu $\Delta sod1$ na syntetyczny barwnik alizarynowy- ABBB oraz produkty jego mikrobiologicznej degradacji (**praca O.6**). Do procesu degradacji/dekoloryzacji użyto szczepów: *Haematonectria haematococca* BwIII43 i *Trichoderma harzianum* BsIII33 pozyskanych z gleby oraz *Haematonectria haematococca* K37 z kompostu (Korniłowicz-Kowalska i Rybczyńska-Tkaczyk 2015). Komórki drożdży zastosowane jako biomarker toksyczności wyjściowego związku oraz produktów jego mikrobiologicznej degradacji dodatkowo różniły się statusem energetycznym uzyskanym po zastosowaniu różnych substratów oddechowych (glukozy i glicerolu). Dzięki temu zabiegowi uzyskano komórki względnie odporne (fermentujące komórki mutantu $\Delta sod1$) oraz wrażliwe (oddychające tlenowo komórki mutantu $\Delta sod1$) na działanie substancji o charakterze prooksydacyjnym. Cecha ta umożliwiła identyfikację potencjalnie prooksydacyjnego charakteru działania ABBB. W celu weryfikacji uzyskanych wyników, wskazujących na prooksydacyjny mechanizm działania ABBB, zastosowano test komplementacji defektów wzrostu mutantu $\Delta sod1$ indukowanych działaniem ABBB za pomocą askorbinianu zastosowanego w stężeniu 10 mM.

Oddziaływanie barwnika na komórki drożdży badano za pomocą pół - ilościowego testu kroplowego i ilościowego testu płytkowego. Natomiast oddziaływanie produktów jego mikrobiologicznej degradacji tylko z wykorzystaniem bardziej czułego testu płytkowego.

Test komplementacji defektu wzrostu indukowanego cytotoksycznymi stężeniami ABBB (2000, 3000 mg/L) w obecności 10 mM askorbinianu wykonano za pomocą wysiewu kroplowego.

Cel czwarty zrealizowano poddając wnikliwej i krytycznej analizie dane literaturowe dotyczące zjawiska podstawowej odporności oraz odporności adaptacyjnej będącej konsekwencją uruchomienia programu odpowiedzi na stres środowiskowy (**praca O.5**). Mechanizm odporności zarówno podstawowej jak i nabytej w wyniku stresu (odporności krzyżowej, cross stress protection) analizowano na różnych poziomach organizacji komórki drożdżowej: fizjologicznym, biochemicznym i genetycznym.

Realizując cel piąty badano oddziaływanie fenolokwasów (pochodnych kwasu benzoowego), fenylopropanoidów (pochodnych kwasu cynamonowego) oraz kumaryny, będącej cyklicznym laktonem kwasu cis-o-hydroksycynamonowego na komórki dzikiego szczepu drożdży *S. cerevisiae* (**prace O.2, O.4**). Analizowano zarówno efekty krótkotrwałego (1 godzina), jak i długotrwałego (dwie doby) oddziaływania związków fenolowych na metabolizm drożdży. Zastosowanie krótkiego czasu działania tych związków miało na celu zbadanie możliwości indukowania przez nie programu ogólnej odpowiedzi stresowej. Zbadano więc i porównano ze standardowymi czynnikami stresogennymi poziom indukcji aktywności cytoplazmatycznej katalazy T, która u drożdży z gatunku *S. cerevisiae* jest biochemicznym markerem ogólnej odpowiedzi stresowej (Święciło i in. 2000). Dodatkowo monitorowano poziom przeżywalności komórek drożdży w obecności tych substancji. Parametr ten informuje o efektywności fizjologicznej czynnika stresogennego. Przyjmuje się, że tylko zakres stężeń czynnika, który nie wywołuje efektów cytotoksycznych może włączać mechanizmy odpowiedzi na stres. Stan taki określany jest terminem łagodny stres (mild stress respons), natomiast stężenia, które prowadzą do obniżenia przeżywalności komórek generują zjawisko określane terminem silny stres (strong stress).

Aplikacja związków fenolowych do podłoża wzrostowego dla drożdży umożliwiała im długotrwałe oddziaływanie na komórki drożdży i miała na celu wykrycie ich potencjalnych właściwości protekcyjnych/antyoksydacyjnych w warunkach silnych stresów środowiskowych. Wykorzystano standardowe czynniki stresogenne - stres termiczny, osmotyczny oraz oksydacyjny. Stresy termiczny i osmotyczny wtórnie generują symptomy stresu oksydacyjnego (Kozioł i in. 2005), co predysponuje je do wykorzystania w charakterze endogennego źródła RFT. Właściwości protekcyjne/antyoksydacyjne związków fenolowych w tym układzie oceniano na podstawie zdolności do przywracania wzrostu komórkom drożdży o obniżonej przeżywalności i aktywności metabolicznej oznaczonej za pomocą barwienia fluorescencyjnego Live-Dead (Live/DeadR Yeast Viability Kit, Molecular Probes, OR) w warunkach silnych stresów środowiskowych.

Cel szósty zrealizowano wykorzystując test komplementacji defektu wzrostu mutantu $\Delta sod1$ spowodowanego działaniem silnego stresu osmotycznego w obecności niskocząsteczkowych antyoksydantów hydrofilowych, takich jak: kwas L-askorbinowy, L-cysteina, zredukowany glutation i wybranych monofenoli: kwasu benzoowego, 4-hydrobenzoowego, syringowego, galusowego, trans-cynamonowego, trans-ferulowego, parakumarowego, kawowego, kumaryny, kempferolu, salicylanu sodu i butylhydroksytoluenu (BHT) (**praca O.7**). Warunki silnego stresu osmotycznego uzyskano dodając do standardowego podłoża hodowlanego dla drożdży - pożywki YPG2%, NaCl w stężeniu 1,2 M (podłoże hipertoniczne).

Warunki te nie ograniczają wzrostu komórek szczepu dzikiego SP4, ale uniemożliwiają wzrost komórek mutanta $\Delta sod1$. Antyoksydanty dodano do upłynnionego i ostudzonego do temp. 50°C podłoża hipertonicznego. Zawiesiny drożdży pochodzące z różnych rozcieńczeń dziesiętnych wyjściowej hodowli wysiewano w formie kropli. Po trzy dobowej inkubacji drożdży oceniano makroskopowo ich wzrost porównując go zarówno do wzrostu komórek tego samego szczepu, jak i izogenicznego szczepu dzikiego SP4 w podłożu hipertonicznym bez żadnych dodatków. Przywrócenie wzrostu dla wszystkich lub tylko niektórych rozcieńczeń komórek mutanta $\Delta sod1$ wskazywało na wyrażający się w systemie komórkowym potencjał antyoksydacyjny badanych związków.

Cel siódmy zrealizowano wykorzystując test komplementacji defektu wzrostu mutanta $\Delta sod1$ spowodowanego działaniem środowiska hipertonicznego w obecności ekstraktów z owoców malin, jeżyn i mieszańca międzygatunkowego malino-jeżyny (**praca O.7**). Ekstrakty wodne z badanych owoców jagodowych zawierały przede wszystkim pulę antyoksydantów hydrofilowych, które w przeciwieństwie do związków hydrofobowych odgrywają u drożdży priorytetową rolę w systemie obronnym przed skutkami stresu oksydacyjnego (Uemura 2012). W ekstraktach oznaczono właściwości antyoksydacyjne za pomocą standardowych testów chemicznych i biochemicznych oraz biodostępność i właściwości antyoksydacyjne ich składników za pomocą reakcji fizjologicznej komórek mutanta $\Delta sod1$. Zawartość związków fenolowych ogółem oznaczono za pomocą zmodyfikowanej metody Singleton i Rossi (1965), antocyjanów za pomocą metody różnicowej opisaną przez Cheng i Been (1991), kwasu L-askorbinowego za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Zdolność ekstraktów do wygaszania wolnego rodnika DPPH[•] (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu) mierzono zgodnie z metodą, którą opisali Brand-Williams i in. (1995). Analizę wygaszania kationorodnika ABTS^{•+} (2,2-azynobis-3-etylobenzo-tiazolino-6-sulfonian) wykonywano metodą Re i in. (1999). Testy biologiczne wykonano dwoma metodami: za pomocą wysiewu kroplowego z serii rozcieńczeń dziesiętnych wyjściowej hodowli drożdży szczepu dzikiego SP4 i mutanta $\Delta sod1$ na stałe podłoże hipertoniczne uzupełnione w ekstrakty stanowiące 5, 10 i 15% (v/v) pożywki oraz ilościowego testu płytkowego. Ten ostatni wykonano wysiewając zawiesinę drożdży szczepu $\Delta sod1$ na stałe podłoże hipertoniczne uzupełnione w ekstrakty z owoców jagodowych w ilości 15% (v/v). Uzyskaną w wyniku tego posiewu liczbę kolonii przeliczono względem liczby kolonii, które wyrosły w próbach kontrolnych, tzn. poddanych działaniu NaCl, ale nie eksponowanych na działanie ekstraktów.

Szczegółowe metody badań wraz z zastosowaną analizą statystyczną wyników zostały opisane w publikacjach składających się na przedstawione osiągnięcie naukowe.

Uzyskane wyniki badań eksperymentalnych mogą stanowić przesłankę do opracowania komercyjnych testów bazujących na komórkach mutanta $\Delta sod1$ służących do analizy jakościowej i ilościowej wybranych elementów ekosystemu rolniczego.

Omówienie wyników badań

Drożdże *S. cerevisiae* o zmienionej aktywności systemu antyoksydacyjnego jako mikroorganizmy testowe w ocenie toksyczności wybranych ksenobiotyków występujących w środowisku rolniczym

W badaniach wstępnych ustalono, że pomimo mniejszej wrażliwości drożdży niż roślin na działanie herbicydu Fusilade Forte 150 EC oraz bioregulatora Betokson Super 025 SL, parametry charakteryzujące wzrost drożdży mogą być markerem niespecyficznego oddziaływania tych substancji (Święciło 2009).

Mając to na uwadze w pierwszej publikacji z cyklu składającego się w myśl ustawy na „dzieło” (praca O.1) zbadalam reakcję dużego zestawu szczepów drożdży o zmienionej aktywności systemu antyoksydacyjnego na te preparaty oraz heteroauksynę (IAA). Pozbawienie komórek drożdży aktywności dysmutazowej zarówno w obszarze cytoplazmy (w przypadku mutantu $\Delta sod1$) jak i matriks mitochondrialnej (w przypadku mutantu $\Delta sod2$) prowadziło do wzrostu ich wrażliwości na substancje aktywne badanych preparatów oraz IAA. Reakcja komórek pojedynczego mutantu $\Delta sod1$, $\Delta sod2$ oraz podwójnego $\Delta sod1als2$ była podobna. Nie obserwowano wzrostu tych komórek w obecności wyższych niż 0,5 mg/mL stężeń fluazifopu-p-butyloвого. Natomiast w obecności wyższych stężeń NOA i IAA obserwowano tylko częściowy wzrost w miejscu wysiewu gęstej zawiesiny komórek tych drożdży. Komórki mutantu oddechowego „petite” były także bardziej wrażliwe na badane substancje niż komórki szczepu dzikiego. Poziom ich wrażliwości na działanie IAA i NOA był porównywalny do wrażliwości mutantów Δsod . Różniły się one tylko wrażliwością na wysokie stężenia fluazifopu-p-butyloвого. W przeciwieństwie do komórek mutantów Δsod komórki niekompetentne oddechowo („petite”) były zdolne do wzrostu w tych warunkach. Obniżenie wewnątrzkomórkowego stężenia glutationu (mutant $\Delta als1$) nie zmieniało reakcji tych komórek na badane substancje, co sugeruje że funkcje tego związku mogą być kompensowane przez inne elementy komórkowego buforu redoks, np. białka zawierające grupy tiolowe. Uzyskane wyniki sugerują, że aktywność dysmutaz ponadtlennokowych oraz funkcje mitochondriów są niezbędne do ochrony komórek drożdży przed szkodliwym działaniem substancji aktywnych preparatów Fusilade Forte 150 EC, Betokson Super 025 SL oraz auksyny (IAA). Wskazuje to na wolnorodnikowy mechanizm ich niespecyficznego oddziaływania.

Warunki hyperoksji uniemożliwiały wzrost komórek mutantu $\Delta sod1$ oraz hamowały wzrost komórek pozbawionych aktywności mitochondrialnej dysmutazy ponadtlennokowej $\Delta sod2$ i funkcjonalnego mitochondrialnego łańcucha przenoszenia elektronów (mutant „petite”). Dane te są zgodne z wynikami wcześniejszych doświadczeń przeprowadzonych przez nasz zespół (Wawryn i in. 2002). Pozbawienie komórek aktywności katalazowej i obniżenie stężenia wewnątrzkomórkowego glutationu nie ograniczało wzrostu drożdży w tych warunkach. Stres oksydacyjny indukowany atmosferą 100% tlenu w przypadku komórek drożdży dysponujących pełnym zestawem enzymatycznych antyoksydantów (szczep *wt* i o obniżonym poziomie glutationu) nie wzmacniał toksyczności badanych substancji. Natomiast wzrost toksyczności obserwowano w przypadku komórek mutantów pozbawionych aktywności mitochondrialnej dysmutazy ponadtlennokowej (mutant $\Delta sod2$) i komórek niekompetentnych oddechowo (mutant „petite”) hodowanych w obecności fluazifopu-p-butyloвого, substancji aktywnej preparatu Fusilade Forte 150 EC. Uzyskane wyniki sugerują, że sprawność procesów mitochondrialnych jest decydującym czynnikiem w systemie ochronnym drożdży przed skojarzonym działaniem stresu oksydacyjnego oraz fluazifopu-p-butyloвого.

Podobne podejście metodyczne zastosowano w badaniach nad niespecyficznymi interakcjami preparatu herbicydowego Herbitor super 440 SE. W tym przypadku, oprócz analizy porównawczej w obrębie zmutowanych szczepów drożdży, przeanalizowano reakcje bakterii należących do dwóch grup różniących się strukturą ściany komórkowej, a co za tym idzie wrażliwością na czynniki środowiskowe - bakterii gram plus (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus*

albus) i gram minus (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*). Większą wrażliwość na działanie tego preparatu wykazywały drożdże niż bakterie. Prawdopodobnie wynika to ze specyfiki działania trichlopyru, jednej z substancji czynnych tego preparatu. Specyficzne oddziaływanie trichlopyru na rośliny polega na hamowaniu procesów syntezy RNA i białka w komórkach, co w konsekwencji prowadzi do hamowania ich wzrostu (Różański 1998). Większa podatność drożdży na szkodliwe działanie tego preparatu może wynikać z podobieństwa struktur i mechanizmów transkrypcji i translacji w obrębie domeny eukariota.

W grupie drożdży najbardziej odpornymi na działanie tego herbicydu okazały się komórki mutanta oddechowego ($\Delta\rho$ -). Dysfunkcja mitochondriów, objawiająca się brakiem aktywności łańcucha oddechowego, wydaje się być kluczowa dla pojawienia się odporności na ten czynnik. Diuron, druga z substancji aktywnych preparatu Herbitor Super 440 SE specyficznie inaktywuje apocytochrom b u drożdży, poprzez wiązanie się z wystającymi poza błonę mitochondrialną resztami aminokwasowymi tego białka (Fisher i Meunier 2008). Blokuje to transport elektronów na łańcuchu oddechowym. U roślin w podobny sposób oddziałuje diuron z plastochinonem przenoszącym elektrony w fazie fotosyntezy zależnej od światła, co prowadzi do zahamowania tego procesu. Brak tych białek lub ich zmieniona konformacja, uniemożliwiająca interakcje z diuronem, może prowadzić do odporności na tego typu substancje. Zjawisko to jest jednym z podstawowych mechanizmów odporności chwastów na herbicydy mocznikowe, do których należy diuron (Mingyang i in. 2014).

Szczególną wrażliwość na preparat Herbitor Super 440 SE wykazywały szczepy drożdży o obniżonej sprawności systemu antyoksydacyjnego, co podobnie jak w przypadku analizowanych wcześniej preparatów, sugeruje udział RFT w mechanizmach ich toksyczności. Brak aktywności katalazowej wywierał jednak w tym przypadku bardziej szkodliwy efekt niż brak aktywności cytoplazmatycznej dysmutazy ponadtlenkowej co wskazuje, że substancje czynne preparatu lub jedna z nich generuje nadtlenek wodoru. Dane literaturowe dostarczają dowodów na poparcie tej tezy. Trichlopyr indukuje syntezę nadtlenu wodoru w tkankach *Galium aparine* L. (Grossmann i in. 2001). Największą wrażliwością na ten herbicyd charakteryzowały się komórki potrójnego mutanta pozbawionego aktywności cytoplazmatycznej dysmutazy ponadtlenkowej oraz cytoplazmatycznej katalazy T i peroksysomalnej katalazy A. Sumowanie się niekorzystnych efektów w tym przypadku najprawdopodobniej wynikało z pozbawienia cytozolu głównych enzymów obrony antyoksydacyjnej. Podobne zjawisko polegające na sumowaniu się niekorzystnych efektów braku tych enzymów zaobserwowałam podczas starzenia się replikacyjnego mutantów drożdży (Wawryn i in. 1999; Świącilo i in. 2000). Mutacja *msn2msn4* prowadzi do umiarkowanego wzrostu wrażliwości na preparat Herbitor Super 440 SE. Strefy zahamowania wzrostu hodowli tego szczepu były mniejsze dla poszczególnych rozcieńczeń tego preparatu niż obserwowane w przypadku mutantów o obniżonej sprawności systemu antyoksydacyjnego, ale większe niż w przypadku szczepu dzikiego. Tak więc mechanizm odpowiedzi stresowej ma także udział w ochronie komórek przed toksycznością tego preparatu. Wyższy poziom odporności, który prezentują komórki szczepu dzikiego od poziomu charakterystycznego dla mutantów $\Delta msn2msn4$, może być wypadkową ich podstawowej tolerancji na szkodliwe czynniki środowiskowe, wynikającej ze sprawności komórkowych mechanizmów obronnych i naprawczych oraz programu odpowiedzi na stres środowiskowy. W konsekwencji uruchomienia programu odpowiedzi na stres środowiskowy syntetyzowane są ze zwiększoną wydajnością nie tylko typowe białka stresu, należące do różnych klas białka szoku termicznego, ale i enzymy antyoksydacyjne, tj. cytoplazmatyczna katalaza T oraz mitochondrialna dysmutaza ponadtlenkowa. Wnikliwa analiza danych literaturowych z tego

zakresu potwierdziła możliwość uruchamiania programu odpowiedzi stresowej przez pestycydy (Święciło 2008). Kwas 2,4 D podobnie jak trichlopyr, należący do grupy herbicydów auksynowych może indukować u drożdży różne mechanizmy adaptacyjne, w tym mechanizm ogólnej odpowiedzi na stres oraz specyficzną odpowiedź na stres oksydacyjny. Jednak z przedstawionych danych wynika, że adaptacyjne mechanizmy obronne odgrywają zdecydowanie mniejszą rolę w obronie komórek drożdży przed toksycznością badanych pestycydów niż sprawność systemu antyoksydacyjnego, uwarunkowana aktywnością dysmutaz ponadtlenkowych.

Dane te korespondują z wynikami badań innych autorów, które przedstawiono i przeanalizowano w **pracy O.5**. Badając mechanizmy odporności na poziomie molekularnym badacze doszli do wniosku, że podstawowy poziom wrażliwości na szkodliwy czynnik środowiskowy zależy przede wszystkim od efektywności procesów degradacji wakuolarniej, transportu pęcherzykowego, związanego z endosomami oraz efektywnej transkrypcji (Dudley i in. 2005; Parsons i in. 2006; Hillenmeyer i in. 2008; Okada i in. 2014). Nie zależy natomiast od mechanizmów regulowanych przez stres. Dodatek antybiotyków hamujących na różnym etapie ekspresję genów związanych z odpowiedzią stresową ani też brak aktywności podstawowych czynników transkrypcyjnych Msn2/4p pośredniczących w uruchamianiu programu ogólnej odpowiedzi na stres, nie zmienia poziomu wrażliwości komórek na pojedynczy silny stres taki jak np. termiczny, osmotyczny czy też obecność nadtlenu wodoru (Berry i Gasch 2008).

Z analizowanego zestawu szczepów drożdży, mutanty pobawione aktywności oddechowej („petite”, Δrho -) i katalazowej ($\Delta ctt1cta1$) wykazywały odmienną, specyficzną dla określonego preparatu reakcję. Natomiast mutanty bezdysmutazowe $\Delta sod1$ charakteryzowały się wrażliwością na wszystkie badane substancje aplikowane zarówno w formie czystego związku, jak i mieszanin wchodzących w skład preparatów pestycydowych. Wynik ten stanowił przesłankę do włączenia tego szczepu do dalszych badań nad niespecyficznym oddziaływaniem syntetycznego barwnika błękitu alizaryny oraz produktów jego mikrobiologicznej degradacji (**praca O.6**). Wykorzystanie przeze mnie drożdży w monitoringu skuteczności procesów degradacji/dekoloryzacji barwników było podejściem nowatorskim, gdyż do tej pory stosowane rutynowo testy toksykologiczne oparte były na organizmach wodnych reprezentujących różne poziomy troficzne oraz na roślinach dwuliściennych (Ferraz i in. 2011; Przystac i in. 2013; Dalsi i in. 2013).

Błękit alizaryny (ABBB) zastosowany w szerokim zakresie stężeń (0-3000 mg/L) okazał się zupełnie nietoksyczny dla fermentujących komórek drożdży, zarówno szczepu dzikiego (*wt*), jak i mutanta $\Delta sod1$. Natomiast komórki mutanta $\Delta sod1$ pozyskujące energię na drodze oddychania tlenowego wykazywały wrażliwość na ABBB proporcjonalną do jego stężenia (w zakresie 500-3000 mg/L). Wzrost komórek tego mutanta przy stężeniach barwnika wynoszących 2000 i 3000 mg/L był zupełnie zahamowany, w przeciwieństwie do komórek szczepu dzikiego, które w tych warunkach rosły podobnie jak w próbie kontrolnej.

Nadwrażliwość komórek mutanta $\Delta sod1$ na ABBB, która manifestowała się tylko w warunkach pełnej aktywności łańcucha oddechowego, wskazywała na powiązania mechanizmu lub mechanizmów toksyczności ABBB ze stresem oksydacyjnym. Potwierdzeniem prooksydacyjnego charakteru działania ABBB był przeprowadzony test komplementacji defektu wzrostu mutanta $\Delta sod1$ (**praca O.6**). Jako czynnik ograniczający wzrost tych komórek zastosowano ABBB w stężeniach 2000 i 3000 mg/L. Po suplementacji podłoża zawierających ABBB w askorbinian o stężeniu 10 mM zaobserwowano przywrócenie wzrostu komórkom mutanta $\Delta sod1$. Ochronne działanie askorbinianu przed skutkami różnych czynników prooksydacyjnych jest znane i opisane w literaturze przedmiotu (Krzepińko i in. 2004; Kwolek-

Mirek i in. 2011). W prezentowanych badaniach użyto go jednak po raz pierwszy do potwierdzenia prooksydacyjnego charakteru barwnika alizarynowego ABBB. Uzyskane wyniki przeczą akceptowanej do tej pory opinii o braku możliwości generowania u drożdży RFT przez antrachinony (Rodriguez i in. 2004).

Płyny uzyskane po hodowli grzybów *H. haematococca* BWIII 43 i *T. harzianum* BSIII 33 w pożywce zoptymalizowanej, zawierające produkty degradacji barwnika ABBB, zaaplikowane w ilości 10 i 20% (v/v) do podłoża wzrostowego dla drożdży, nie wykazywały toksycznego działania zarówno w stosunku do szczepu dzikiego *wt*, jak i mutantu $\Delta sod1$. Takie same efekty obserwowano bez względu na indukowany substratem oddechowym typ metabolizmu energetycznego tych drożdży. Podobnie, na przeżywalność drożdży obu szczepów nie wpływał płyn po hodowli grzyba *H. haematococca* K37, aplikowany w ilości 10% (v/v). Jedynie istotnie statystycznie ($p < 0.01$) obniżenie przeżywalności zanotowano dla oddychających tlenowo komórek mutantu $\Delta sod1$ (pożywka YPG) w obecności 20% (v/v) dodatku płynu po hodowli tego szczepu. Podobną reakcję na ten sam płyn pohodowlany wykazywały fibroblasty ludzkie, co sugeruje, iż oba systemy (drożdżowy i linie komórkowe ssaków) wykazują wiele podobieństw w zakresie metabolizmu barwników antrachinonowych.

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* o zmienionej aktywności systemu antyoksydacyjnego jako mikroorganizmy testowe w ocenie właściwości antyoksydacyjnych naturalnych i syntetycznych przeciwutleniaczy oraz próbek materiału roślinnego

Antyoksydantami nazywamy związki, które charakteryzują się możliwością „zmiatania” rodników lub zapobiegania reakcjom utlenienia, a w szerszym ujęciu także przeciwdziałania skutkom wywoływanym przez reakcje wolnorodnikowe (Halliwell i Gutteridge 2007). Zdolność do tego typu reakcji ocenia się najczęściej metodami *in vitro*. Związki zakwalifikowane na tej podstawie do grupy antyoksydantów nie zawsze wykazują działanie antyoksydacyjne w testach *in vivo*. Do tej kategorii można zaliczyć związki fenolowe, które w badaniach klinicznych z udziałem ludzi wykazują właściwości antyoksydacyjne, antyproliferacyjne i proapoptyczne (Rice-Evans i in. 1996; Grassmann i in. 2002; Golonko i in. 2015), natomiast na poziomie pojedynczej komórki nie zawsze wywołują pozytywne skutki (Kozioł i in. 2005).

W pracy O.2 zbadano możliwość uruchamiania przez wybrane monofenole programu ogólnej odpowiedzi stresowej (ESR), która mogłaby stanowić podłoże obserwowanych u wyższych eukariota pozytywnych efektów ich działania. W ramach tego programu metabolicznego wzrasta między innymi poziom obrony antyoksydacyjnej w wyniku indukcji syntezy niektórych enzymów antyoksydacyjnych (katalazy T oraz MnSOD) oraz sprawność komórkowych systemów naprawczych. W obecności analizowanych kwasów fenolowych nie stwierdzono jednak symptomów świadczących o uruchomieniu tego programu. Synteza katalazy T, drożdżowego markera odpowiedzi stresowej nie była w tych warunkach indukowana. Z analizowanych związków fenolowych tylko kwas galusowy zastosowany w stężeniach wyższych niż 10 mM aktywował ten program, chociaż prawdopodobnie poprzez mechanizm związany z obniżeniem pH środowiska. Wyższe niż 10 mM stężenia kwasów: ferulowego, p-kumarowego, cynamonowego, trans-cynamonowego i benzoesu sodu wywoływały w różnym stopniu nasilone efekty cytotoksyczne. Natomiast na poziomie biochemicznym fenolokwasy hamowały indukowaną stresem syntezę katalazy T, pomimo obecności indukujących ogólną odpowiedź stresową stężeń alkoholu etylowego (4-8%), użytego jako rozpuszczalnika tych

związków. Hamowanie syntezy białek hemowych - cytochromów i katalazy T wydaje się być uniwersalnym zjawiskiem towarzyszącym silnym stresom środowiskowym, gdyż podobne efekty zaobserwowałam w obecności wysokich stężeń azotanu (III) sodu oraz pyretroidów (Święciło i Gardiasz 2007; Krzepińko i Święciło 2008).

W kolejnej pracy (**praca O.4**) zaprezentowano wyniki badań dotyczących możliwości ochronnych fenolokwasów przed skutkami silnych stresów środowiskowych. Efekty te badałam za pomocą testu komplementacji defektu wzrostu komórek drożdży szczepu dzikiego SP4 indukowanego działaniem silnych stresów środowiskowych - osmotycznego, termicznego i oksydacyjnego. Zastosowane silne stresse obniżały aktywność metaboliczną komórek drożdży oraz poziom ich przeżywalności do około 50% wyjściowej wartości tego parametru.

W ramach przeprowadzonych badań ustalono fizjologicznie efektywne zakresy stężeń analizowanych monofenoli, czyli najwyższe stężenia, które nie indukowały efektów cytotoksycznych. W przypadku syntetycznego monofenolu - BHT wartość ta odpowiadała stężeniu 0,05 mM, kumaryny - 0,7 mM, kwasów: trans-ferulowego, trans-cynamonowego 4-hydroksybenzoesowego oraz benzoowego - 1 mM, kwasu kawowego i kumarynowego - 1,25 mM, a kwasu galusowego - 5 mM.

Suplementacja podłoży wzrostowych w monofenole zastosowane w tych stężeniach nie poprawiała parametrów wzrostu komórek drożdży osłabionych silnymi stresami, a niektóre z nich dodatkowo obniżyły ich przeżywalność. Brak pozytywnych efektów działania monofenoli w przypadku komórek drożdży preinkubowanych w warunkach silnego stresu termicznego i osmotycznego może wynikać ze specyficznych dla tych stresów uszkodzeń, które nie mogą być kompensowane antyoksydacyjnym działaniem monofenoli. Antyoksydanty fenolowe okazały się także nieskuteczne w ochronie komórek drożdży szczepu dzikiego przed skutkami silnego stresu oksydacyjnego generowanego zarówno nadtlenkiem wodoru, jak i menadionem. W świetle uzyskanych wyników rola antyoksydantów fenolowych w mechanizmach obronnych drożdży przed skutkami silnego stresu oksydacyjnego wydaje się być dyskusyjna. Jako antyoksydanty, którym przypisuje się działanie interwencyjne polegające przede wszystkim na terminowaniu łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych można było oczekiwać, że będą one skuteczne w eliminowaniu uszkodzeń oksydacyjnych makromolekuł komórkowych. Jednak efektów tego typu działania nie stwierdzono ani w przeprowadzonych doświadczeniach, ani w badaniach, w których zamiast silnego stresu oksydacyjnego zastosowano cytotoksyczne dawki pyretroidów, pestycydów o udokumentowanym działaniu prooksydacyjnym (Krzepińko i Święciło 2009).

Wyniki te skłoniły mnie do poszukiwań innego drożdżowego układu doświadczalnego w którym właściwości antyoksydacyjne związków fenolowych oraz innych antyoksydantów obecnych w próbkach materiału roślinnego byłyby wyrażane oraz mogłyby być prezentowane w formie ilościowej. W tym celu zostały przeprowadzone testy komplementacyjne z wykorzystaniem komórek mutanta $\Delta sod1$, który z racji swojej nadwrażliwości na działanie prooksydantów, już we wcześniejszych badaniach okazał się dobrym bioindykatorem obecności tego typu substancji w środowisku rolniczym (**prace O.1, O.3, O.6**). Po suplementacji podłoża hipertonicznego (hamującego wzrost komórek mutanta $\Delta sod1$) w antyoksydanty tiolowe (L-cysteinę i zredukowany glutation), askorbinian oraz niektóre monofenole - kwas galusowy, kumarynę i salicylan sodu zaobserwowano poprawę parametrów wzrostu komórek tego mutanta. Intensywność wzrostu stymulowana obecnością tych antyoksydantów była uzależniona od zakresu użytych stężeń. Całkowite przywrócenie wzrostu tj. do poziomu charakterystycznego dla komórek szczepu dzikiego obserwowano tylko w przypadku askorbinianu zastosowanego w zakresie stężeń 30 - 50 mM oraz kumaryny w stężeniu 1,5 mM. Askorbinian w stężeniu 10

mM, zredukowany glutation w zakresie stężeń: 5-7 mM, kwas galusowy w stężeniach od 0,5 do 1 mM i salicylan sodu w zakresie stężeń od 1 do 2,5 mM przywracały częściowo wzrost tym komórkom, tzn. tylko w miejscu wysiewu najgęstszych zawiesin drożdżowych. Ochronne działanie tych monofenoli w warunkach skojarzonego działania silnego stresu osmotycznego i oksydacyjnego jest pierwszym tego typu udokumentowanym doniesieniem. Trudny w interpretacji jest jednak brak efektu stosowania pozostałych monofenoli, zarówno naturalnych jak i syntetycznego - BHT. Przedstawione dane nie są jednak odosobnione. Zespół Koziół i in. (2005) badając efektywność w tym samym układzie doświadczalnym szeregu antyoksydantów (naturalnych i syntetycznych) stwierdził podobną selektywność ich działania. Mechanizm, który prowadzi do obserwowanych przeze mnie i innych autorów korzystnych skutków działania niektórych antyoksydantów w komórkach mutantu *Δsod1* w warunkach hipertonicznych nie jest jednoznaczny. Najprawdopodobniej obserwowany efekt ochronny wydaje się być wypadkową ich wpływu na stan buforu redoks tioli zawartych w puli glutationu i/lub puli białek, regeneracji białek żelazo-siarkowych [4Fe-4S] oraz ich zdolności do obniżania poziomu RFT.

Antyoksydanty, które okazały się skuteczne w ochronie komórek mutantu *Δsod1* przed skutkami silnego stresu osmotycznego są specyficzne dla materiału roślinnego. W związku z tym sprawdzono, czy ten sam test byłby przydatny do ich detekcji w próbkach środowiskowych. Do badań wybrano ekstrakty wodne z owoców jagodowych, gdyż cechuje je wysoka zawartość biologicznie aktywnych fitozwiązków, z których wiele wykazuje właściwości antyoksydacyjne (Manganaris i Golas 2014). Z analizowanych ekstraktów najwyższą zawartością związków fenolowych, antocyjanów oraz kwasu L-askorbinowego charakteryzował się ekstrakt z owoców mieszańca międzygatunkowego (hybrydy) malino-jeżyny, w którym zawartość tych związków wynosiła odpowiednio: $4056,79 \pm 114$ μg ekwiwalentu kwasu galusowego (GAE)/mL, $559,82 \pm 5,30$ μg ekwiwalentu cyjanidyno-3 glukozydu/mL i $115,83 \pm 5,45$ $\mu\text{g}/\text{mL}$. W ekstraktach z owoców malin zawartość związków fenolowych mieściła się w zakresie od $406,05 \pm 3,21$ do $1182,53 \pm 165,76$ a jeżyn w zakresie od $1005,32 \pm 321,54$ do $3511,11 \pm 104,08$ μg GAE/mL. Zawartość antocyjanów w ekstrakcie z owoców dzikiej jeżyny była 7-10 razy wyższa niż w ekstraktach z owoców form uprawnych jeżyn i malin.

Biorąc pod uwagę zawartość kwasu L-askorbinowego, ekstrakty zaklasyfikowano do 5 grup homogennych, oznaczonych na podstawie różnicy pomiędzy wartościami średnimi ($p \leq 0,05$). Najwyższą zawartością tego związku cechował się ekstrakt z owoców mieszańca malino-jeżyny, następnie dzikiej jeżyny ($73,90 \pm 4,51$), w dalszej kolejności plasował się ekstrakt z owoców maliny odmiany Octavia ($52,03 \pm 4,81$), następnie jeżyny odmiany Navaho ($38,0 \pm 2,06$ $\mu\text{g}/\text{mL}$). Ostatnią grupę stanowiły ekstrakty z malin Glen Fyne i Cascade Delight o średniej zawartości kwasu L-askorbinowego wynoszącej $15,3 \pm 2,43$ $\mu\text{g}/\text{mL}$. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze doniesienia wskazujące na istotność czynnika genetycznego w kształtowaniu chemicznych oraz pośrednio antyoksydacyjnych właściwości materiału roślinnego (Capocasa i Scalzo, 2008).

Badając właściwości antyoksydacyjne ekstraktów za pomocą dwóch różnych testów biochemicznych (z wykorzystaniem rodników ABTS^{•+} i DPPH[•]) odnotowano, że metoda polegająca na neutralizacji kationorodnika ABTS^{•+} była w przypadku analizowanych ekstraktów bardziej czuła, co prawdopodobnie wynikało z różnic metodycznych obu oznaczeń (Almeida i wsp. 2011). Właściwości antyoksydacyjne analizowanych ekstraktów były ściśle uzależnione od zawartości

w nich antocyjanów. Najwyższą aktywność przeciwrodnikową (w obu testach) w przeliczeniu na zawartość barwników antocyjanowych odnotowano dla ekstraktu uzyskanego z owoców

maliny odmiany Octavia. Właściwości antyoksydacyjne ekstraktów wyrażone jako IC50 w przeliczeniu na zawartość związków fenolowych były znacznie słabsze. W teście polegającym na neutralizacji DPPH[•] najwyższą aktywność przeciwrodnikową wykazywał ekstrakt z maliny odmiany Cascade Delight, natomiast w teście wykorzystującym kationorodnik ABTS^{•+}– ekstrakt z dzikiej jeżyny.

Analizując właściwości antyoksydacyjne ekstraktów *in vivo*, gdzie jako kryterium właściwości antyoksydacyjnych przyjęto ich zdolność do przywracania wzrostu komórkom mutanta $\Delta sod1$ w podłożu hipertonicznym odnotowano, że wszystkie analizowane ekstrakty były pod tym względem efektywne. Intensywność wzrostu komórek mutanta $\Delta sod1$ była uzależniona od objętości ekstraktu w podłożu, czyli stężenia związków bioaktywnych. Efekt antyoksydacyjny bioskładników ekstraktów po części był maskowany przez zjawisko związane z obniżeniem stężenia NaCl w pożywkach, po dodaniu do nich stosunkowo dużych objętości płynu (5, 10, 15%). Aby sprecyzować w jakim stopniu przywracany jest wzrost komórek mutanta $\Delta sod1$ pod wpływem składników ekstraktów oceniono, poziom ich przeżywalności za pomocą wysiewu na pojedyncze kolonie.

W największym stopniu wzrost komórkom drożdży przywracał ekstrakt wodny z owoców mieszańca malina x jeżyna, a następnie owoców maliny odmiany Cascade Delight oraz jeżyn odmian Navaho oraz formy dzikiej. Słabsze właściwości antyoksydacyjne w tym teście wykazywały ekstrakty z owoców malin uprawnych odmian Glen Fyne i Octavia. Należy jednak podkreślić, że nawet najbardziej efektywne ekstrakty nie były zdolne do całkowitego przywrócenia wzrostu komórkom mutanta $\Delta sod1$. Podobny poziom przywrócenia wzrostu odnotowano nie tylko dla ekstraktów, które zawierały najwyższe stężenia badanych fitozwiązków czyli hybrydy i odmiany dzikiej jeżyny ale także dla ekstraktu z jeżyny uprawnej odmiany Navaho, zawierającego niższe stężenia tych substancji oraz maliny Cascade Delight i Glen Fyne, które charakteryzowały się stosunkowo niską zawartością tych związków. Zawartość kwasu L-askorbinowego w hipertonicznych pożywkach wzrostowych wprowadzona w formie ekstraktu z owoców mieszańca wynosiła około 0,1 mM, a w przypadku pozostałych ekstraktów była jeszcze niższa. Natomiast bazując na wynikach testu komplementacji wzrostu wykonanego z zastosowaniem czystych antyoksydantów stężenie kwasu L-askorbinowego wymagane do uzyskania efektu częściowego przywrócenia wzrostu komórkom mutanta $\Delta sod1$ wynosiło 10 mM. Podobnie, stężenie związków fenolowych (wyrażonych jako GAE) wprowadzonych do podłoża hipertonicznego w formie ekstraktu z owoców mieszańca malino-jeżyny było o ponad połowę niższe od wymaganego do wywołania efektu częściowego przywrócenia wzrostu komórkom mutanta $\Delta sod1$. Tak więc, ochronne działanie składników ekstraktów z badanych owoców jagodowych jest prawdopodobnie wynikiem synergistycznego lub addytywnego oddziaływania różnych związków biologicznie czynnych w nich zawartych. Oprócz L-askorbinianu i związków fenolowych owoce jagodowe zawierają liczne inne związki o udokumentowanych właściwościach antyoksydacyjnych, które mogą przyczynić się do obserwowanych w warunkach przeprowadzonych doświadczeń efektów antyoksydacyjnych (Manganaris i in. 2014). Należy jednak podkreślić, że wartości te słabo korespondują z właściwościami antyoksydacyjnymi oznaczonymi w ramach tej pracy za pomocą testów *in vitro* z wykorzystaniem rodników ABTS^{•+} i DPPH[•]. Tego typu rozbieżności są znane i szeroko opisywane w literaturze naukowej (Slatnar i in. 2012). Wynikają one najprawdopodobniej ze specyfiki obu oznaczeń. Testy z ABTS^{•+} i DPPH[•] mierzą zdolność do wygaszania sztucznych wolnych rodników w wyniku ich jednoelektronowej redukcji w zdefiniowanych kontrolowanych warunkach *in vitro*, natomiast test z zastosowanymi komórkami drożdży mierzy zdolność

antyoksydantów do hamowania procesów biochemicznych zainicjowanych działaniem RFT, czego przejawem jest reakcja fizjologiczna polegająca na przywróceniu zdolności do wzrostu tych komórek w warunkach przeprowadzonego doświadczenia.

Podsumowanie

W cyklu publikacji naukowych, powiązanych tematycznie, które stanowią podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego przedstawiłam wyniki badań własnych dotyczących możliwości wykorzystania drożdży *S. cerevisiae* o zmienionej aktywności systemu antyoksydacyjnego do oceny toksyczności wybranych ksenobiotyków występujących w środowisku rolniczym oraz właściwości antyoksydacyjnych materiału roślinnego

W badaniach tych wykorzystywałam biotesty bazujące na szczepach dzikich i zmutowanych drożdży *S. cerevisiae*. Duża plastyczność metabolizmu drożdży, którą można modyfikować zarówno warunkami hodowli jak i na poziomie genetycznym predysponuje je do wykorzystania w tym celu. Analizie poddałam mutanty o różnej sprawności systemu antyoksydacyjnego wynikającej z braku aktywności podstawowych enzymów antyoksydacyjnych: dysmutaz ponadtlenkowych i katalaz, obniżenia wewnątrzkomórkowego stężenia glutationu, braku indukowanej w warunkach stresu środowiskowego syntezy enzymów antyoksydacyjnych oraz dysfunkcji mitochondriów, skutkującej brakiem aktywności oddechowej tych organeli. Status metaboliczny tych komórek dodatkowo modyfikowałam stosując różne substraty oddechowe oraz warunki natlenienia hodowli.

Wśród całej gamy analizowanych mutantów drożdżowych tylko komórki pozbawione aktywności dysmutazowej wykazywały podobny poziom wrażliwości na wszystkie badane preparaty pestycydowe a także heteroauksynę. Wyniki te stały się przesłanką do wykorzystania po raz pierwszy tego systemu komórkowego do badania toksyczności barwnika alizarynowego ABBB oraz produktów jego enzymatycznej degradacji. W przypadku tego barwnika oraz produktów jego dekoloryzacji przez szczep *H. haematococca* K37 wrażliwość ta manifestowała się u oddychających tlenowo komórek tego mutantu. Uzyskane wyniki wskazują na uniwersalny wolnorodnikowy mechanizm niespecyficznego oddziaływań tych ksenobiotyków oraz w pełni dowodzą zasadności wykorzystania mutantu $\Delta sod1$ drożdży *S. cerevisiae* do tego typu badań środowiskowych.

Zastosowanie komórek mutantu $\Delta sod1$ umożliwia także potwierdzenie prooksydacyjnego charakteru badanych związków. Przydatnym w tym zakresie okazał test komplementacji defektu wzrostu tego mutantu w obecności antyoksydantów np. L-askorbinianu. Dzięki temu podejściu jednoznacznie potwierdziłam prooksydacyjny mechanizm działania antrachinonów w komórkach drożdży, co do tej pory było kwestionowane.

Testy bazujące na parametrach wzrostu komórek mutantu $\Delta sod1$ ze względu na nieskomplikowaną procedurę wykonania i analizę wyników mogą stanowić alternatywę do standardowych testów toksykologicznych. Oprócz możliwości oznaczenia potencjału toksycznego badanych substancji wnoszą one dodatkowe informacje o potencjalnym mechanizmie ich działania.

Komórki mutantu $\Delta sod1$ okazały się także użytecznym narzędziem do detekcji związków o charakterze antyoksydacyjnym. Za pomocą testu komplementacji defektu wzrostu tego mutantu indukowanego silnym stresem osmotycznym stwierdzono antyoksydacyjny efekt szeregu związków tiolowych (L-cysteiny, zredukowanego glutationu), L-askorbinianu oraz niektórych monofenoli (kwasu galusowego, kumaryny, salicylanu sodu). Ochronne działanie tych

monofenoli w warunkach stresu osmotycznego oraz generowanego wtórnie stresu oksydacyjnego jest pierwszym tego typu doniesieniem. Ten sam test okazał się także przydatny do detekcji właściwości antyoksydacyjnych bioskładników wodnych ekstraktów z owoców jagodowych, chociaż należy podkreślić, że uzyskane wartości słabo korespondowały z ich właściwościami antyoksydacyjnymi oznaczonymi za pomocą metody *in vitro* bazującej na zdolności tych ekstraktów do „zmiatania” syntetycznych rodników ABTS^{•+} i DPPH[•]. Opracowany w ramach zaprezentowanych badań test może stanowić etap pośredni pomiędzy badaniami probówkowymi *in vitro* a badaniami przeprowadzanymi na liniach komórkowych ssaków lub całym wielokomórkowym organizmie. W przeciwieństwie do testów chemicznych i biochemicznych biotest z wykorzystaniem komórek mutantu $\Delta sod1$ wnosi dodatkowe informacje o przyswajalności związków biologicznie czynnych obecnych w próbkach żywności oraz ich niespecyficznych efektach komórkowych.

Literatura

- Almeida E.J.R., Corso C.R.** 2014. Comparative study of toxicity of azo dye Procion Red MX-5B following biosorption and biodegradation treatments with the fungi *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus*. *Chemosphere*, 112, 317–322. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.04.060>
- Almeida M.M.B., Sousa P.H.M., Arriaga A.M.C., do Prado G.M., Magalhães C.E.d C., Maia G.A., Lemos T.L.G.** 2011. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Res. Int.*, 44, 2155–2159. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.051>
- Ashraf M.A., Iqbal M., Rasheed R., Hussain I., Riaz M., Arif M.A.** 2018. Environmental stress and secondary metabolites in plants: an overview. In: Ahmad P., Ahanger M.A., Singh V.P., Tripathi D.K., Alam P., Alyemeni M.N. (Eds.), *Plant metabolites and regulation under environmental stress*. Academic Press is an imprint of Elsevier, ISBN: 978-0-12-812689-9, 153–167.
- Berry D.B., Gasch A.P.** 2008. Stress-activated genomic expression changes serve a preparative role for impending stress in yeast. *Mol. Biol. Cell*, 19: 4580–4587. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-07-0680>
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C.** 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.*, 28, 25–30. [http://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](http://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Burkishaw S.M.** 1990. Application of dyes. In: Waring D.R., Hallas G. (Eds.), *The Chemistry and Application of Dyes*. Plenum Press, New York and London, pp. 255.
- Capocasa F., Scalzo J., Mezzetti B., Battino M.** 2008. Combining quality and antioxidant attributes in the strawberry: the role of genotype. *Food Chem.*, 111, 872–878. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.068>
- Causton H.C., Ren B., Koh S.S., Harbison C.T., Kanin E., Jennings E.G., Lee T.I., True H.L., Lander E.S., Young R.A.** 2001 Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell.*, 12, 323–337. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.2.323>
- Cheng G.W., Breen P.J.** 1991. Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 116, 865–869.
- Daâssi D., Zouari-Mechichi H., Frikha F., Martinem M.J., Nasi M., Mechichi T.** 2013. Decolorization of the azo dye Acid Orange 51 by laccase produced in solid cultures of a newly isolated *Trametes trogii* strain. *Biotech.*, 3, 115–125. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0076-2>
- Dudley A.M., Janse D.M., Tanay A., Shamir R., Church G.M.** 2005. A global view of pleiotropy and phenotypically derived gene function in yeast. *Mol. Syst. Biol.*, 1:2005.0001. <https://doi.org/10.1038/msb4100004>
- Ferraz E.R.A., Grando M.D., Oliveira D.P.** 2011. The azo dye Disperse Orange 1 induces DNA damage and cytotoxic effects but does not cause ecotoxic effects in *Daphnia similis* and *Vibrio fischeri*. *J. Hazard. Mater.*, 192, 628–633. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.05.063>

- Fisher N., Meunier B.** 2008. Molecular basis of resistance to cytochrome bc1 inhibitors. *FEMS Yeast Res.*, 8, 183–192. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00328.x>
- Garay-Arroyo A., Lledías F., Hansberg W., Covarrubias A.A.** 2003. Cu,Zn-superoxide dismutase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for resistance to hyperosmosis. *FEBS Lett.* 539, 68–72. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00199-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00199-6)
- Gasch A.P., Spellman P.T., Kao C.M., Carmel-Harel O., Eisen M.B., Storz G., Botstein D., Brown P.O.** 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell.*, 11, 4241–4257. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4241>
- Ghaly A.E., Ananthashankar R., Alhattab M., Ramakrishnan V.V.** 2014. Production, characterization and treatment of textile effluents: a critical review. *J. Chem. Eng. Process Technol.*, 5, 1–19. <https://doi.org/10.4172/2157-7048.1000182>
- Golonko A., Kalinowska M., Świsłocka R., Lewandowski W.** 2015. Zastosowanie związków fenolowych i ich pochodnych w przemyśle i medycynie. *Budownictwo i inżynieria środowiska.* 6, 161-179.
- Grossmann J., Hippeli S., Elstre E.F.** 2002. Plant's defense mechanism and its benefits for animal and medicine. Role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiol. Biochem.*, 40, 471–478.
- Grossmann K., Kwiatkowski J., Tresch S.** 2001. Auxin herbicides induce H₂O₂ overproduction and tissue damage in cleavers (*Galium aparine* L.). *J. Exp. Bot.*, 52, 1811–1816. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.362.1811>
- Gururani M.A., Venkatesh J., Tran L.S.P.** 2015. Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. *Mol Plant*, 8, 1304–1320. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.05.005>
- Halliwell B., Gutteridge J.** 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th edn. Oxford: Oxford University Press.
- Hillenmeyer M.E., Fung E., Wildenhain J., Pierce S.E., Hoon S., Lee W., Proctor M., St Onge R.P., Tyers M., Koller D., Altman R.B., Davis R.W., Nislow C., Giaever G.** 2008. The chemical genomic portrait of yeast: uncovering a phenotype for all genes. *Science* 320, 362–365. <https://doi.org/10.1126/science.1150021>
- Hooper P.L., Hooper P.L., Tytell M., High L.** 2010. Xenohormesis: health benefits from an eon of plant stress response evolution. *Cell Stress Chaperones*, 15, 761-770. <https://doi.org/10.1007/s12192-010-0206-x>
- Horii Y., Khim J.S., Higley E.B., Giesy J.P., Ohura T., Kannan K.** 2009. Relative potencies of individual chlorinated and brominated polycyclic aromatic hydrocarbons for induction of aryl hydrocarbon receptor-mediated responses. *Environ. Sci. Technol.*, 43, 2159–2165. <https://doi.org/10.1021/es8030402>
- Howitz K.T., Sinclair D.A.** 2008. Xenohormesis: sensing the chemical cues of other species. *Cell*, 133, 387-391. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.019>
- Jin X.C., Liu G.Q., Xu Z.H., Tao W.Y.** 2007. Decolorization of a dye industry effluent by *Aspergillus fumigatus* XC6. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74, 239–243. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0658-1>
- Khan R., Bhawana P., Fulekar M.H.** 2013. Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 12, 75–97. <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9287-6>
- Kornilowicz-Kowalska T., Rybczyńska-Tkaczyk K.** 2015. Screening of microscopic fungi and their enzyme activities for decolorization and biotransformation of some aromatic compounds. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 12, 2673-2686. <https://doi.org/10.1007/s13762-014-0656-2>
- Kozioł S., Zagulski M., Bilinski T., Bartosz G.** 2005. Antioxidants protect the yeast *Saccharomyces cerevisiae* against hypertonic stress. *Free Radic. Res.*, 39, 365–371. <https://doi.org/10.1080/10715760500045855>
- Krzepilko A., Święcilo A.** 2009. Do antioxidants counteract the toxic effects of pyrethroids on *Saccharomyces cerevisiae* yeast?. *Ecol. Chem. Eng. A*, 16, 1171-1178.
- Krzepilko A., Święcilo A., Wawryn J., Zdrażg R., Kozioł S., Bartosz G., Biliński T.** 2004. Ascorbate restores lifespan of superoxide-dismutase deficient yeast. *Free Radic. Res.*, 38, 1019-1024. <https://doi.org/10.1080/10715760410001717327>

- Kwolek-Mirek M., Bartosz G., Spickett C.M.** 2011. Sensitivity of antioxidant-deficient yeast to hypochlorite and chlorite. *Yeast*, 28, 595–609. <https://doi.org/10.1002/yea.1889>
- Kwolek-Mirek M., Bednarska S., Bartosz G., Biliński T.** 2009. Acrolein toxicity involves oxidative stress caused by glutathione depletion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biol. Toxicol.*, 25, 363–78. <https://doi.org/10.1007/s10565-008-9090-x>
- Lewinska A., Bilinski T., Bartosz G.** 2004. Limited effectiveness of antioxidants in the protection of yeast defective in antioxidant proteins. *Free Radic. Res.*, 38, 1159–1165. <https://doi.org/10.1080/10715760400009860>
- Liu M., Hulting A.G., Mallory-Smith C.A.** 2014. Characterization of multiple-herbicide-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* spp. Multiflorum). *Pest Manag. Sci.*, 70, 1145 – 1150.
- Mahapatra N.N.** 2016. *Textile Dyes* (Woodhead Publishing India in Textiles). CRC Press. Taylor & Francis Group, pp. 76.
- Manganaris G.A., Goulas V., Vicente, A. R., Terry L.A.** 2014. Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. *J. Sci. Food Agric.*, 94, 825-833. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6432>
- Okada N., Ogawa J., Shima J.** 2014. Comprehensive analysis of genes involved in the oxidative stress tolerance using yeast heterozygous deletion collection. *FEMS Yeast Res.*, 14, 425–434. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12136>
- Oleszczuk P.** 2007. Biodostępność i bioakumulacja hydrofobowych zanieczyszczeń organicznych. Część I. Informacje ogólne. *Biotechnologia*, 76, 9-25.
- Parsons A.B., Lopez A., Givoni I.E., Williams D.E., Gray C.A., Porter J. et. all.** 2006. Exploring the mode-of-action of bioactive compounds by chemical-genetic profiling in yeast. *Cell* 126, 611-625. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.040>
- Penninckx M.** 2000. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme Microb. Technol.*, 26, 737–742. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00165-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00165-4)
- Penninckx M.J.** 2002. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non- conventional yeasts. *FEMS Yeast Res.*, 2, 295-305. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00081-8](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00081-8)
- Przystaś W., Zabłocka-Godlewska E., Grabińska-Sota E.** 2013. Effectiveness of dyes removal by mixed fungal cultures and toxicity of their metabolites. *Water Air Soil Pollut.*, 224, 1534. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1534-0>
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.** 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 26, 1231–1237.
- Ribeiro I.C., Veríssimo I., Moniz L., Cardoso H., Sousa M.J., Soares A.M., Leão C.** 2000. Yeasts as a model for assessing the toxicity of the fungicides penconazol, cymoxanil and dichlofluanid. *Chemosphere*, 41, 1637 – 1642. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00039-4](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00039-4)
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G.** 1996. Structure, antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, 20, 933–956. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)
- Rodriguez C.E., Shinyashiki M., Froines J., Yu R.C., Fukuto J.M., Cho A.K.** 2004. An examination of quinone toxicity using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Toxicology*, 201, 185–196.
- Różański L.** 1998. Przemiany pestycydów w organizmach żywych i środowisku. Wydawnictwo Agra-Enviro Lab, Poznań, 311–313.
- Sadowska-Bartosz I., Pączka A., Maloń M., Bartosz G.** 2013. Dimethyl sulfoxide induces oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, 13, 820-830. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12091>
- Singleton V.L., Rossi J.A.** 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 144–158.
- Slatnar A., Jakopic, J., Stampar F., Veberic R, Jamnik P.** 2012. The Effect of bioactive compounds on in vitro and in vivo antioxidant activity of different berry juices. *PLoS ONE*, <https://doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0047880>

- Świącilo A.** 2008. Odpowiedź stresowa drożdży *Saccharomyces cerevisiae* na herbicydy. Chem. Dydakt. Ekol. Metrol., 13, 101-109
- Świącilo A.** 2009. Effect of Betokson Super and Fusilade preparations and indoleacetic acid (IAA) on some physiological processes of the radish (*Raphanus sativus* L.) and the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Ecol. Chem. Eng. A, 16, 661-669.
- Świącilo A., Gardiasz Z.** 2007. Response of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells to sodium nitrate (III) and (V). Pol. J. Environ. Stud., 16, 263-267.
- Świącilo A., Krawiec Z., Wawryn J., Bartosz G., Biliński T.** 2000. Effect of stress on the life span of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*? Acta Biochim. Pol., 42 (2), 355-364
- Świącilo A., Krzepilko A.** 2005. Rola systemu antyoksydacyjnego w odpowiedzi komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* na silny stres solny. Zesz. Probl. Postęp. Nauk Rol., 505, 451-459.
- Uemura H.** 2012. Synthesis and production of unsaturated and polyunsaturated fatty acids in yeast: current state and perspectives. App. Microbiol. Biotechnol., 95, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4105-1>
- Vaithanomsat P., Apiwatanapiwat W., Petchoy O., Chedchant J.** 2010. Decolorization of reactive dye by white-rot fungus *Datronia* sp. KAPI0039. Kasetart J. Nat. Sci., 44, 879–890.
- Viau C., Pungartnik C., Schmitt M.C., Basso T.S.P., Henriques J.A., Brendel M.** 2006. Sensitivity to Sn⁺ of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* depends on general energy metabolism, metal transport, anti-oxidative defences, and DNA repair. BioMetals., 19, 705–714. <https://doi.org/10.1007/s10534-006-9007-1>
- Wallace M.A., Bailey S., Fukuto J.M., Valentine J.S., Gralla E.B.** 2005. Induction of phenotypes resembling CuZn-superoxide dismutase deletion in wild-type yeast cells: an in vivo assay for the role of superoxide in the toxicity of redox-cycling compounds. Chem. Res. Toxicol., 18, 1279–1286. <https://doi.org/10.1021/tx050050n>
- Wawryn J., Krzepilko A., Myszk A., Bilinski T.** 1999. Deficiency in superoxide dismutases shortens life span of yeast cells. Acta Biochim. Pol., 46, 249–253.
- Wawryn J., Swiecilo A., Bartosz G., Bilinski T.** 2000. Effect of superoxide dismutase deficiency on the life span of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. An oxygen-independent role of Cu,Zn- superoxide dismutase. Biochim. Biophys. Acta, 1570, 199–202.
- Yang P., Shi W., Wang H., Liu H.** 2016. Screening of freshwater fungi for decolorizing multiple synthetic dyes. Braz. J. Microbiol., 47, 828–834. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.06.010>
- Zabłocka-Godlewska E., Przysaś W.** 2016. Badania screeningowe bakterii wykazujących zdolność do dekoloryzacji barwników syntetycznych. Archiwum Gospodarki Odpadami i Ochrony Środowiska, 18, 15-24.
- Żyracka E.** 2014. Antyoksydanty i toksyczne działanie kadmu na komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. ECoPole., 8, 321-338. [https://doi.org/10.2429/proc.2014.8\(1\)043](https://doi.org/10.2429/proc.2014.8(1)043)
- Żyracka E., Zadrag R., Koziol S., Krzepilko A., Bartosz G., Biliński T.** 2005b. Ascorbate abolishes auxotrophy caused by the lack of superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae* yeast can be a biosensor for antioxidants. J. Biotechnol., 115, 271-278.
- Żyracka E., Zadrag R., Koziol S., Krzepilko A., Bartosz G., Biliński T.** 2005a. Yeast as a biosensor for antioxidants: simple growth tests employing a *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in superoxide dismutase. Acta Biochim. Pol., 52, 679–684.

V. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO – BADAWCZYCH

a) przebieg pracy naukowo - badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora

Swoją działalność naukowo-badawczą rozpoczęłam w 1992 roku, wraz z realizacją pracy magisterskiej pod tytułem: „Izolacja mutantów *Rhizobium meliloti* pochodnych szczepu F1 opornych na fagi”. Badania, które wtedy prowadziłam w Zakładzie Mikrobiologii, UMCS, pod kierunkiem prof. dr hab. M. Kowalskiego wykraczały poza ramy pracy magisterskiej

i przyczyniły się do opracowania zgłoszenia patentowego nr. 320834, pt. „Nowy szczep bakterii *Rhizobium meliloti*”, który został udzielony przez Urząd Patentowy RP w dniu 30.05.2003. Szczep, będący przedmiotem wynalazku charakteryzujący się opornością na wszystkie fagi laboratoryjne otrzymano w wyniku wprowadzenia przez transdukcję mutacji szczepu *Rhizobium meliloti* L5 - 30 FR II do szczepu *Rhizobium meliloti* L5 - 30 FR III. Nowy szczep oznaczono symbolem *Rhizobium meliloti* L5 - 30 FR i zdeponowano w kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych, Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno- Spożywczego w Warszawie, pod numerem KKP/700/p. Po manipulacjach genetycznych prowadzących do oporności na fagi, szczep ten zachował wysoką aktywność symbiotycznego wiązania azotu atmosferycznego, co przejawiało się w formie wzrostu zielonej masy roślin lucerny w stosunku do roślin nie szczepionych lub szczepionych szczepem *Rhizobium meliloti* nieefektywnym w wiązaniu azotu atmosferycznego.

Po ukończeniu studiów na kierunku biologia, specjalność mikrobiologia w 1993r. zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w Zakładzie Biochemii, Instytutu Nauk Rolniczych w Zamościu i włączyłam się w nurt badań prowadzonych w tej jednostce pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. T. Bilińskiego. Zaowocowały one szeregiem publikacji naukowych oraz doniesień konferencyjnych a także złożyły się one na moją rozprawę doktorską pt.: „Fizjologiczne aspekty reakcji drożdży na stres”, którą obroniłam w 2002 r. przed Sekcją Mikrobiologiczno-Biochemiczną, Rady Wydziału BiNoZ UMCS.

Tematyka prowadzonych przeze mnie badań w tym czasie dotyczyła głównie roli czynników genetycznych i środowiskowych w procesie starzenia pojedynczych komórek drożdży. Czynniki genetyczne analizowałam w kontekście opisanych wcześniej mutantów delecyjnych o zmienionej aktywności systemu antyoksydacyjnego. Ich wybór do tego typu badań wynikał z założeń wolnorodnikowej teorii starzenia, jednej z najpopularniejszej teorii wyjaśniającej uniwersalne podłoże procesu starzenia. Jako czynnik środowiskowy zastosowałam warunki indukujące odpowiedź na stres termiczny, osmotyczny, alkoholowy i oksydacyjny. Przesłanką do ich uwzględnienia w tych badaniach były dane wskazujące na powiązania programu metabolicznego indukowanego odpowiedzią na stres środowiskowy z różnymi procesami fizjologicznymi komórek drożdży.

Zanim jednak przystąpiłam do głównego nurtu badań koniecznym okazało się znalezienie łatwego do oznaczania w warunkach laboratoryjnych wskaźnika odzwierciedlającego poziom odpowiedzi na stres środowiskowy. Markerem tym okazała się aktywność cytoplazmatycznej katalazy T. Poziom aktywności tego enzymu zależał nie tylko od efektywności czynników stresowych, ale także od stanu metabolicznego komórek drożdży wynikającego z różnych warunków hodowli. Odpowiedź na stres, mierzona aktywnością katalazy T wyrażała się w pełni tylko w komórkach rosnących w obecności glukozy (czyli w warunkach słabo i silnie wyrażonej represji glukozowej). Natomiast w warunkach pełnej derepresji układu oddechowego (czyli na pożywce zawierającej nie podlegające fermentacji źródła węgla) lub w warunkach derepresji enzymów szlaków odpowiedzialnych za biosyntezę monomerów komórkowych (pożywka Go) test katalazowy okazał się nieprzydatny do oceny poziomu odpowiedzi stresowej. W ramach przeprowadzonych badań stwierdzono także, że synteza katalazy T jest indukowana zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych przez czynniki stresowe. Wysoka aktywność tego enzymu zaobserwowana w warunkach stresu termicznego i osmotycznego w atmosferze beztlenowej miała przełomowe znaczenie poznawcze w biologii komórek eukariotycznych, gdyż poddawała w wątpliwość powszechnie akceptowany pogląd o braku syntezy białek hemowych (których przedstawicielem jest katalaza T) w nieobecności tlenu.

W badaniach nad starzeniem się pojedynczych komórek drożdży zastosowałam nowatorską w tym czasie technikę mikromanipulacji. Polegała ona na liczeniu komórek potomnych (pączków), które były w stanie utworzyć komórki macierzyste drożdży w określonych warunkach hodowli z jednoczesnym oddzielaniem ich od komórki macierzystej za pomocą mikromanipulatora sprzężonego z mikroskopem. Liczba wyprodukowanych przez komórkę drożdżową pączków była miernikiem tzw. replikacyjnej długości ich życia (replicative life span), obecnie określanej terminem zdolności reprodukcyjnej. Parametr ten jest odpowiednikiem starzenia się aktywnych mitotycznie komórek organizmów wyższych. Porównując długość życia komórek różnych szczepów dzikich oraz pochodzących od nich tych samych mutantów odnotowano znaczne różnice, co sugerowało, że proces starzenia nie może być rozpatrywany jako zjawisko czysto stochastyczne, a zestaw posiadanych przez komórkę genów (tzw. tło genetyczne) może modyfikować długość ich życia. Dlatego w dalszych badaniach procesu starzenia drożdży efekty wywoływane zarówno przez czynniki genetyczne jak i środowiskowych analizowano w układach izogenicznych.

Za najważniejsze wyniki uzyskane w toku tych badań uważam:

- brak aktywności cytoplazmatycznej i mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej prowadzi do wyraźnego skrócenia replikacyjnej długości życia komórek drożdży
- brak aktywności katalazy T i A nie modyfikuje w istotny sposób długość życia tych mutantów
- brak aktywności cytoplazmatycznej dysmutazy ponadtlenkowej w połączeniu z brakiem aktywności mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej wykazuje silnie addytywny efekt, prowadząc do ograniczenia replikacyjnej długości życia tych komórek do zaledwie kilku podziałów
- szoki termiczny, osmotyczny lub termiczny i osmotyczny stosowane w kolejności, aplikowane periodycznie przez całą długość życia komórek drożdży przedłużają życie replikacyjne drożdży (efekt ten nie jest zależny od tła genetycznego szczepów użytych do badań)
- pojedynczo zastosowany szok termiczny może wydłużać życie tylko komórek szczepów charakteryzujących się krótkim czasem życia

Równolegle do tych badań współuczestniczyłam w pracach nad właściwościami biologicznymi biohumusów, które zaowocowały opracowaniem metodyki badania ich właściwości antyoksydacyjnych za pomocą zmodyfikowanej metody Catherine Rice-Evans i Nicholas Miller.

Reasumując, mój dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora obejmuje: 6 oryginalnych prac eksperymentalnych (II.A.1.1, II.A.1.2, II.A.1.3, II.D.7, II.D.8, II.D.9)*, w tym 3 opublikowane zostały w czasopiśmie znajdującym się w bazie JCR (II.A.1.1, II.A.1.2, II.A.1.3) oraz 5 komunikatów konferencyjnych (III.B.1-5). Łączny IF tych prac, zgodny z rokiem opublikowania, wynosi 2,067, a sumaryczna liczba punktów MNiSW – 26.

* - numeracja według wykazu opublikowanych prac naukowych i informacji o osiągnięciach dydaktycznych i popularyzacji nauki zamieszczonych w Załączniku 4.

b) przebieg pracy naukowo - badawczej po uzyskaniu stopnia doktora

Równolegle do badań, które stanowią podstawę osiągnięcia naukowego, samodzielnie prowadziłam lub współuczestniczyłam w prowadzeniu innych badań naukowych. Obszar moich zainteresowań naukowych można podzielić według kilku grup tematycznych:

- regulacja procesu starzenia się drożdży *S. cerevisiae*,
- wpływ stresów abiotycznych: naturalnych i antropogenicznych na mikroorganizmy oraz organizm roślinny
- aktywność mikroorganizmów w środowiskach antropogenicznych
- czynniki kształtujące jakość biologiczną surowców roślinnych

Regulacja procesu starzenia się drożdży *S. cerevisiae*

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam badania nad starzeniem się drożdży. Polegały one między innymi na określeniu roli metabolizmu tlenowego drożdży oraz niskocząsteczkowego antyoksydanta, L-askorbinianu w tym procesie (II.A.1.4, II.A.1.5) Zgodnie z wolnorodnikową teorią starzenia, wskazującą na dominującą rolę RFT w regulacji długości życia drożdży, oba czynniki powinny modyfikować ten parametr. Oddychające tlenowo komórki drożdży są narażone na zwiększone uwalnianie RFT, co może być czynnikiem ograniczającym ich długość życia, natomiast podaż egzogenego antyoksydanta, usuwającego rodniki tlenowe mógłby w tej sytuacji niwelować ten niekorzystny efekt. Jednak uzyskane w trakcie tych badań wyniki nie do końca były zgodne z założeniami tej teorii. Atmosfera beztlenowa (uniemożliwiająca powstawanie RFT) oraz niska zawartość tlenu (3%) nie wpływały w istotny sposób na proces starzenia się pojedynczych komórek drożdży szczepu dzikiego ani komórek mutantów $\Delta sod1$. Podobnie, nie odnotowano istotnych zmian w długości życia pojedynczych komórek szczepu dzikiego w obecności 100% tlenu. Natomiast komórki drożdży mutantu $\Delta sod1$ nie były wcale zdolne do wykonywania podziałów komórkowych w tych warunkach. Suplementacja podłoża mikromanipulacyjnego w askorbinian w wysokim stężeniu (80mM) prowadziła do niewielkiego wydłużenia średniej długości życia komórek mutantu $\Delta sod1$ rosnącego przy dostępie powietrza lub w 100% tlenie. W przypadku komórek szczepu dzikiego rosnących w atmosferze zawierającej 100% tlen obserwowano negatywny efekt działania tego antyoksydanta w postaci skrócenia ich średniej i maksymalnej długości życia. Wyraźnie korzystne oddziaływanie askorbinianu na komórki mutantu $\Delta sod1$ odnotowano w warunkach zapobiegających jego autooksydacji, czyli po zastosowaniu procedury systematycznej wymiany podłoża mikromanipulacyjnego zawierającego świeżo przygotowaną pulę askorbinianu. W tym przypadku uległa nie tylko wydłużeniu średnia, ale także maksymalna długość ich życia zbliżając się do wartości charakterystycznych dla komórek szczepu dzikiego. Należy zaznaczyć, że badania polegające na mikromanipulacji w atmosferze o kontrolowanej zawartości gazów stały się możliwe po opracowaniu przez nasz zespół techniki prowadzenia tego typu eksperymentów.

W oparciu o te wyniki oraz dane literaturowe z zakresu gerontologii drożdży *S. cerevisiae* w pracy II.D.1 podsumowałam aktualny stan wiedzy dotyczący podstaw molekularnych regulacji procesu starzenia u tego organizmu. Najistotniejszym wnioskiem płynącym z tej analizy jest stwierdzenie, że rozpatrywane przeze mnie geny kodujące białka sytemu antyoksydacyjnego są konieczne nie do wydłużenia życia komórkom drożdży ale do zapewnienia im „normalnej” długości życia.

Innym podejściem do zagadnienia starzenia się komórek drożdży może być tzw. starzenie się chronologiczne (chronological life span), oznaczające przeżywalność komórek drożdży w hodowli okresowej i wyrażone w jednostkach czasu (najczęściej jako liczba dni). Jest to uznany model badania nie dzielących się, post-mitotycznych komórek organizmów wyższych. Przeprowadzone w tym układzie analizy gerontologiczne szczepu dzikiego drożdży oraz jego mutantów bezdysmutazowych potwierdziły istnienie związku między intensywnością

chronologicznego starzenia się drożdży a sprawnością sytemu antyoksydacyjnego (II.D.28). Brak aktywności dysmutaz ponadtlenkowych skutkowało skróceniem maksymalnej długości życia tych komórek oraz obniżeniem poziomu ich przeżywalności w początkowej fazie hodowli. Komórki drożdży pochodzące ze starej (43 dniowej) hodowli okresowej, pomimo zaniku zdolności do proliferacji były nadal żywe, co sugerowało, że w warunkach hodowli stacjonarnej mogą one przekształcać się w formę nie zdolną do wzrostu na pożywkach mikrobiologicznych (viable but non culturable, VBNC).

Wpływ stresów abiotycznych: naturalnych i antropogenicznych na mikroorganizmy oraz organizm roślinny

Reakcja stresowa jako odpowiedź organizmu na niekorzystne czynniki środowiskowe była moim głównym nurtem badań naukowych. Zagadnienia związane z tym zjawiskiem rozpatrywałam praktycznie oraz teoretycznie nie tylko na modelu drożdżowym ale także bakteryjnym i roślinnym. Postuluje się, że wiele szlaków przekazywania sygnałów o stresie oraz uruchamianych przez nie reakcji efektorowych przebiega podobnie u wszystkich organizmów żywych począwszy od jednokomórkowych prokariotycznych mikroorganizmów aż po eukariotyczne organizmy wielokomórkowe, w tym wyższe eukariota. Na poziomie komórkowym wyróżnia się całą gamę efektów biochemicznych i fizjologicznych, które można ogólnie podzielić na dwie kategorie - efekty charakterystyczne dla warunków łagodnego stresu (zwolnienie tempa wzrostu, podwyższenie poziomu obrony antyoksydacyjnej i sprawności komórkowych mechanizmów obronnych i naprawczych, pojawienie się odporności na czynniki stresowe) i efekty związane z silnym stresem (zatrzymanie wzrostu, cytotoksyczność). Reaktywnym formom tlenu (RFT) przypisuje się zarówno w jednym jak i drugim przypadku rolę wtórnego przekaźnika sygnału o stresie. Ponadto, w warunkach silnego stresu środowiskowego reakcje wolnorodnikowe stanowią podłoże obserwowanych szkodliwych skutków działania tego czynnika. Mając na uwadze uniwersalny charakter odpowiedzi stresowej interesującym zagadnieniem było porównanie reakcji odległych ewolucyjnie organizmów na podobny zakres czynników stresowych.

U bakterii glebowych wyróżnia się co najmniej kilka programów odpowiedzi na stres. Zostały one szczegółowo przedstawione w pracy II.A.1.7. Należą do nich odpowiedź ścisła (stringent response), system SOS, ogólna odpowiedź na stres (general stress response), odpowiedź na uszkodzenie błony komórkowej (envelope stress response), system toksyna/antytoksyna (toxin-antitoxin systems, TA), odpowiedź na stres oksydacyjny (oxidative stress response) oraz mechanizm odpowiedzi na zagęszczenie komórek w populacji (quorum sensing, QS). Bakteryjna odpowiedź stresowa determinuje różnorodne funkcje mikroorganizmów takie jak przetrwanie okresów głodu, przystosowanie się do obecności antybiotyków, syntezę substancji antybiotycznych, wchodzenie w interakcje z eukariotycznym symbiontem, wiązanie azotu atmosferycznego. Na poziomie ekosystemu zdolność do uruchomienia programu odpowiedzi na środowiskowe czynniki stresowe przyczynia się do utrzymania stanu równowagi klimaksowej, czyli ustabilizowanego ilościowo i jakościowo zespołu mikroorganizmów danego środowiska, co w końcowym efekcie rzutuje na aktywność biologiczną gleby.

Badania reakcji stresowej na poziomie jednokomórkowego organizmu eukariotycznego jakim są drożdże *S. cerevisiae* miały w naszym zespole ugruntowaną pozycję. Mój wkład w poznanie niektórych aspektów tej reakcji został omówiony w części autoreferatu opisującej mój dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora. Po doktoracie, skoncentrowałam się na

analizie odpowiedzi komórek drożdży na niektóre ważne z punktu widzenia rolniczego naturalne (zasolenie) jak i antropogeniczne (handlowe preparaty pestycydowe oraz substancje aktywne wykorzystywane do produkcji tego typu preparatów) czynniki stresowe. Chemizacja rolnictwa i narastające zanieczyszczenie środowiska pestycydami uzasadniały konieczność podjęcia tego typu badań. Do ważnych osiągnięć w tym obszarze naukowym należy opisanie reakcji stresowej komórek drożdży na preparaty Cyperkill Super 25EC (II.D.10) oraz Basta (II.D.12). W badaniach tych stwierdzono toksyczność substancji aktywnych tych preparatów dla drożdży a zaobserwowane zmiany aktywności systemu antyoksydacyjnego, przejawiające się w formie zmian aktywności katalazy potwierdziły występowanie stresu oksydacyjnego jako wtórnego efektu metabolizmu tych pestycydów. Podobne skutki wywoływały w komórkach drożdży syntetyczne pyretroidy, wykorzystywane jako insektycydy w produkcji rolniczej oraz ochronie sanitarnej.

Badane pyretroidy indukowały zależne od stężenia efekty cytotoksyczne dla komórek drożdży szczepu dzikiego, przy czym komórki w logarytmicznej fazie wzrostu okazały się bardziej wrażliwe na te substancje niż pochodzące ze stacjonarnej fazy wzrostu (II.A.1.6). Aby zobrazować zmiany w strukturze i funkcjach komórek drożdżowych indukowane działaniem pyretroidów zastosowano techniki barwień klasycznych i fluorescencyjnych (II.D.14).

Analizowane pyretroidy (cypermetryna, alfametryna, deltametryna, bifentryna) naruszały integralność błon komórkowych, obniżały aktywność metaboliczną komórek drożdży oraz zaburzały homeostazę redoks środowiska wewnętrznego, co wskazuje na powiązania ich mechanizmu działania z systemem obrony antyoksydacyjnej. Potwierdzeniem prooksydacyjnego charakteru ich oddziaływania były wyniki badań przedstawione w pracy II.D.16. Oznaczając całkowitą zdolność antyoksydacyjną (CZA) metodą ABTS⁺ w ekstraktach z komórek drożdży szczepu dzikiego w obecności tych substancji stwierdzono obniżenie wartości tego parametru w stosunku do kontroli. Wartość CZA była jednak wyższa dla ekstraktów wykonanych z komórek preinkubowanych z pyretroidami pochodzących ze stacjonarnej fazy wzrostu niż ekstraktów z komórek pochodzących z fazy logarytmicznej, co wskazuje na wyjściowo wyższy poziom aktywności systemu antyoksydacyjnego w komórkach w tej fazie wzrostu.

Powinowactwo pyretroidów do błon biologicznych, stwierdzone za pomocą barwień może być przyczyną zwiększenia częstości mutantów Δrho^- pojawiających się wśród komórek przeżywających po inkubacji z pyretroidami (II.A.1.6). Prawdopodobnie jako związki hydrofobowe zaburzają one strukturę błon mitochondrialnych i uniemożliwiają transport metabolitów koniecznych do syntezy mitochondrialnych hemoproteidów takich jak cytochromy, co prowadzi do inhibicji aktywności łańcucha oddechowego. Jak już wspomniano we wstępie autoreferatu, taki defekt metaboliczny w przypadku komórek drożdży nie prowadzi do śmierci, ponieważ w tej sytuacji mogą one wykorzystywać alternatywny sposób zdobywania energii za pomocą fermentacji. Jednak aktywne oddechowemu mitochondria są niezbędne do prawidłowej komunikacji międzyorganelarnej, co rzutuje m.in. na stabilność jądrowego genomu i prawidłową długość życia komórek drożdży.

Obserwowane obniżenie potencjału antyoksydacyjnego komórek drożdży w obecności pyretroidów było przesłanką do podjęcia badań mających na celu potwierdzenie ich prooksydacyjnego charakteru i wskazanie lokalizacji indukowanych przez nie uszkodzeń. W tym celu wykonano test komplementacji defektu wzrostu indukowanego toksycznym działaniem wybranych pyretroidów za pomocą różnych antyoksydantów działających w obrębie środowiska hydrofilowego (kwas askorbinowy), hydrofobowego (α -tokoferol, kwas palmitylo-6-askorbinowy) i obu tych środowisk (kwas bursztynylotokoferolowy) (II.D.23). Nie stwierdzono

jednak znaczącego wpływu badanych antyoksydantów na przeżywalność komórek drożdży w obecności pyretroidów. Jedynie przy niższych dawkach cypermetryny, tetrametryny i permetryny zanotowano niewielki wzrost przeżywalności tych komórek w próbie z α -tokoferolem, co potwierdza wcześniejsze wyniki wskazujące na środowisko hydrofobowe komórki jako główne miejsce działania tych związków.

W świetle tych danych oraz wyników publikacji włączonych do prezentowanego osiągnięcia naukowego prooksydacyjne działanie pestycydów wydaje się być uniwersalnym mechanizmem ich niespecyficznego oddziaływania na komórki drożdży. Tezę tę wspierają także wyniki badań innych autorów, które zostały przeanalizowane i przedstawione w pracy II.D.18. Substancje aktywne najczęściej wykorzystywanych na świecie herbicydów parakwat i 2,4D generują w komórkach drożdży RFT jako produkty uboczne ich biotransformacji. W przypadku parakwatu jest to anionorodnik ponadtlenkowy powstający w reakcji kationorodnika parakwatu z tlenem. Natomiast w przypadku 2,4D jest to najprawdopodobniej rodnik hydroksyloxy. Zgodnie z przedstawionym wyżej schematem, sugerującym udział RFT w odpowiedzi stresowej odnotowano, że oba związki uruchamiają u grzybów mikroskopowych program odpowiedzi na stres oksydacyjny a 2,4D dodatkowo ogólną odpowiedź na stres środowiskowy.

Stres solny (zasolenie) jest jednym z najważniejszych czynników abiotycznych ograniczających produkcję roślinną na świecie. Efekty tego stresu rozpatrywane na poziomie pojedynczych komórek i całego organizmu roślinnego oraz komórek mikroorganizmów są dość dobrze poznane, ale interakcje mechanizmu odpowiedzi na ten czynnik ze sprawnością systemu antyoksydacyjnego były w tamtym okresie mniej zbadane. Rolę enzymów antyoksydacyjnych drożdży w odpowiedzi na stres indukowany przez NaCl, NaNO₃ i NaNO₂ opisałam w pracach II.D.13, II.D.15, II.D.17, II.D.20.

W warunkach łagodnego stresu solnego indukowanego NaCl obserwowano wzrost aktywności katalazy T, drożdżowego markera stresu środowiskowego przy niezmiennym poziomie przeżywalności tych komórek. Natomiast w warunkach silnego stresu solnego nie stwierdzono za pomocą tego wskaźnika aktywacji programu odpowiedzi na stres środowiskowy, a jedynie zależne od stężenia zastosowanej soli efekty cytotoksyczne. Pozbawienie komórek aktywności cytoplazmatycznej dysmutazy ponadtlenkowej (mutant $\Delta sod1$) prowadziło do nadwrażliwości na ten czynnik, natomiast dysfunkcja mitochondriów (mutant Δrho -) powodowała przeciwny efekt fizjologiczny. Aktywność katalazowa nie wpływała w istotny sposób na poziom wrażliwości komórek drożdży na tę sól.

Interesującą reakcję komórek drożdżowych różniących się sprawnością systemu antyoksydacyjnego oraz aktywnością mitochondriów odnotowano po aplikacji azotanu (III) oraz (V) sodu. Kompetentne oddechowio komórki pozbawione głównych enzymów antyoksydacyjnych (*sod1sod2rho+*, *ctt1ctt1rho+*) charakteryzowały się większą wrażliwością na azotan (V) sodu niż komórki pozbawione funkcjonalnych mitochondriów lub pochodzące ze stacjonarnej fazy wzrostu. Odwrotną tendencję zaobserwowano po zastosowaniu azotanu (III) sodu. Uzyskane wyniki świadczą o zupełnie różnych drogach biotransformacji tych związków w komórkach drożdży. Wyniki te potwierdzają badania przedstawione w pracy II.D.17. Azotan (V) sodu zastosowany w zakresie stężeń od 0,25 do 0,7 mol/L uruchamiał program odpowiedzi na stres środowiskowy, natomiast w przypadku azotanu (III) sodu (w całym zakresie analizowanych stężeń) takiej reakcji nie stwierdzono. Poza tym, azotan (III) sodu zastosowany w stężeniu 0,02 mol/L hamował syntezę *de novo* hemoprotein drożdżowych (katalazy T i cytochromów) i/lub prowadził do denaturacji istniejących białek.

Menadion (2-metylo-1,4 naftochinon) jest powszechnie stosowanym w praktyce

laboratoryjnej czynnikiem prooksydacyjnym, którego mechanizm działania związany jest z cyklami redoks w komórce. Wyniki moich wcześniejszych badań zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej wskazują, że związek ten zastosowany w relatywnie niskim stężeniu uruchamia komórkowe mechanizmy odpowiedzi na stres środowiskowy. Może on także indukować efekty cytotoksyczne, których zakres jest uzależniony od stężenia i sprawności komórkowego systemu antyoksydacyjnego (II.D.11). Innym czynnikiem, który modyfikuje potencjał cytotoksyczny tego prooksydanta jest status energetyczny komórek drożdży (II.D.21). W tej pracy, metabolizm energetyczny drożdży modyfikowałam poprzez zastosowanie różnych substratów oddechowych a wykorzystanie izogenicznych kompetentnych i niekompetentnych oddechowio komórek (o fenotypach rho^+ i rho^-) jednoznacznie determinowało rodzaj metabolizmu energetycznego (oddychanie tlenowe, fermentacja). W warunkach pełnej aktywności oddechowej drożdży (dziki fenotyp rho^+) w obecności nie ulegającego fermentacji źródła węgla, jakim jest etanol zanotowano większą wrażliwość komórek drożdży na manadion niż w warunkach represji układu oddechowego (pożywka zawierająca 2% lub 10% glukozę) lub w przypadku komórek mutantu niezdolnego do oddychania tlenowego (mutant Δrho^-) oraz w obecności słabo fermentowalnego źródła węgla jakim jest rafinoza. Uzyskane wyniki umożliwiły skonstruowanie układu doświadczalnego wykorzystanego do identyfikacji potencjalnych właściwości prooksydacyjnych ksenobiotyków analizowanych w publikacjach zaliczonych do osiągnięcia naukowego.

Do badania skutków działania czynników stresowych wykorzystałam także organizmy roślinne, głównie rzodkiewkę zwyczajną *Raphanus sativus* L. Rzodkiewka zwyczajna jest nie tylko bardzo popularnym warzywem, uzupełniającym dietę człowieka w szereg makro i mikroelementów oraz witamin, ale także uznanym organizmem modelowym w badaniach ekotoksykologicznych i rolniczych. Na siewkach rzodkiewki zwyczajnej badałam oddziaływanie czynników stresowych typowych dla warunków upraw polowych tej rośliny. Wśród nich znalazły się zarówno naturalne czynniki stresogenne (suboptymalna temperatura, substancje o potencjale allelopatycznym, takie jak monofenole) jak i pochodzenia antropogenicznego (zasolenie, preparaty pestycydowe, substancje aktywne pestycydów).

W pracy II.D.27 porównano kondycję fizjologiczną zaprawianych zaprawą nasienną T75 DS/WS i niezaprawianych nasion rzodkiewki *Raphanus sativus* L. w warunkach suboptymalnej temperatury (10°C) i zasolenia. Niska temperatura wzmacniała niekorzystne efekty zaprawiania w odniesieniu do procesu kiełkowania i wzrostu siewek. Zasolenie indukowane 0,5% KCl całkowicie hamowało kiełkowanie nasion, natomiast 0,16% KCl hamował w 83% kiełkowanie nasion zaprawianych oraz w 90% kiełkowanie nasion niezaprawianych rzodkiewki. Zasolenie w niewielkim stopniu wpływało na procesy elongacji siewek, prowadząc do redukcji ich długości i długości korzenia zarodkowego. Zaprawianie nasion rzodkiewki opóźniało kiełkowanie nasion, hamowało także elongację siewek ale całkowicie eliminowało mikroflorę grzybową z powierzchni nasion. Tak więc chemiczne metody dezynfekcji oparte na pestycydach wchodzących w skład zapraw nasiennych pomimo tego, że są bardzo skuteczne, czego dowodzą nie tylko prezentowane wyniki badań laboratoryjnych ale także powszechnie znane efekty ich praktycznego zastosowania w uprawach polowych mogą modyfikować szybkość wzrostu roślin w początkowej fazie ich wegetacji. Niektóre z wykorzystywanych w tym celu fungicydów oddziałują bezpośrednio na metabolizm roślin i zaburzają ich procesy fizjologiczne, bądź wpływają na nie pośrednio eliminując wrażliwe grzyby stanowiące barierę ochronną przed glebowymi patogenami roślin. Teza ta znalazła potwierdzenie w badaniach zaprezentowanych w pracy II.D.32.

Azoksytrobina, fungicyd należący do klasy strobiluryn hamowała zarówno wzrost

saprofitycznych grzybów (*S. cerevisiae* i *Penicillium sp*) jak i proces oddychania u kiełkujących nasion i wzrost elongacyjny korzenia, a w mniejszym stopniu wzrost całych siewek.

Mając na uwadze potencjał fitotoksyczny pestycydów stosowanych do zaprawiania nasion obecnie trwają poszukiwania alternatywnych preparatów i sposobów ich aplikacji, które byłyby skuteczne w dezynfekcji nasion, lecz nie wywoływałyby negatywnych skutków dla roślin uprawnych i środowiska. Dane literaturowe wskazują, że takie właściwości wykazują niektóre nanomateriały. Substancje te zastosowane w odpowiednio dobranym stężeniu nie akumulują się w organizmach ani w środowisku. W kolejnej pracy II.A.1.11 porównano zatem oddziaływanie nanocząstek srebra (nAg) i srebra w formie jonowej (AgNO_3) na aktywność mikroflory epifitycznej nasion i wczesne etapy rozwoju kukurydzy cukrowej *Zea mays ssp. saccharata*. W pracy tej zastosowano niestandardowe podejście metodyczne, gdyż roztwory srebra jonowego i nanocząstkowego zostały użyte do kondycjonowania nasion kukurydzy przez co oddziaływały one stosunkowo krótko na organizm rośliny, ale za to w krytycznym dla niej momencie, tj. w fazie kiełkowania nasion. Uzyskane wyniki badań potwierdzają skuteczność kondycjonowania nasion kukurydzy w roztworze wodnym AgNO_3 w dezynfekcji nasion, ale jednocześnie wskazują na możliwość następczego hamującego wpływu tej formy srebra na późniejsze etapy rozwoju rośliny. Natomiast zastosowane w analogiczny sposób roztwory nAg wykazywały wprawdzie słabszy efekt aseptyczny, ale okazały się bardziej skuteczne fizjologicznie i bezpieczne dla rośliny, za czym przemawiał brak oznak fitotoksyczności tego nanomateriału.

W tym samym obszarze naukowym mieszczą się badania porównawcze dotyczące efektów działania herbicydów i biostymulatorów wykorzystywanych w produkcji roślinnej na organizm rzodkiewki oraz drożdży *S. cerevisiae* (II.D.22, II.D.25). Reakcja rzodkiewki w tym układzie doświadczalnym stanowiła wzorzec oddziaływań specyficznych, natomiast drożdże posłużyły do analizy ubocznych efektów ich zastosowania. Inny aspekt oddziaływań specyficznych w stosunku do organizmu rzodkiewki zwyczajnej został poruszony w pracach II.D.19, II.D.24. Analizowano w nich efekty działania monofenoli, związków o potencjale allelopatycznym. W pracach tych oceniano kondycję metaboliczną i fizjologiczną nasion rzodkiewki zwyczajnej *Raphanus sativus* L., poddanych działaniu wybranych kwasów fenolowych lub ich soli. Uzyskane wyniki wskazują, że analizowane substancje różnią się potencjałem fitotoksyczności w stosunku do tego organizmu. Cecha ta była także uzależniona od zastosowanego stężenia i czasu działania danego związku. Najsilniejsze właściwości fitotoksyczne w odniesieniu do procesów elongacji korzenia zarodkowego oraz kiełkowania w analizowanym układzie wykazywał kwas 4-hydroksybenzoesowy (II.D.24). Właściwości te najprawdopodobniej związane były z aktywnością łatwo dyfundujących przez ściany komórkowe i błony biologiczne niezdysonowanych cząsteczek tego kwasu. Wzrost pH środowiska prowadził do wzrostu stężenia form anionowych kwasów fenolowych co było równoznaczne z obserwowanym w tych oraz badaniach innych autorów obniżeniem aktywności biologicznej kwasów fenolowych.

Aktywności mikroorganizmów w środowiskach antropogenicznych

W ramach badań obejmujących ten aspekt moich zainteresowań naukowych uczestniczyłam w pracach dotyczących wpływu różnych form oddziaływań antropogenicznych takich jak wielkostadny chów i hodowla zwierząt gospodarskich oraz efekty nowej generacji materiałów powłokowych na aktywność mikroorganizmów.

W pracy II.D.26 porównano stan mikrobiologiczny powietrza w kurniku na fermie oraz

w indywidualnym gospodarstwie rolnym. W obu obiektach oznaczono liczebność mikroorganizmów za pomocą metody sedymentacyjnej Kocha. Powietrze w kurniku tradycyjnym w obu terminach badań charakteryzowało się wyższą liczbą bakterii psychrofilnych, mezofilnych, hemolizujących oraz grzybów niż w przypadku powietrza w kurniku na fermie. Liczebność bakterii psychrofilnych, mezofilnych oraz grzybów w kurniku tradycyjnym w ciągu czterech tygodni zmieniała się w dość szerokim zakresie, co najprawdopodobniej wynikało ze zmian warunków termicznych wewnątrz tego budynku. Natomiast w przypadku powietrza w kurniku na fermie zmiany liczebności mikroorganizmów w tym samym okresie nie były znaczące i prawdopodobnie wynikały ze zmian parametrów mikroklimatycznych związanych z procesami wzrostu kurcząt.

W pracy II.A.1.10 badano właściwości antymikrobiologiczne folii skrobiowych za pomocą zmodyfikowanej wersji testu dyfuzyjno-krażkowego. Nowatorskim podejściem w tych badaniach było uwzględnienie oprócz rutynowo stosowanych mikroorganizmów także przedstawicieli środowisk naturalnych: gleby - *B. subtilis*, powietrza i gleby - *A. niger* oraz ryzosfery i fyllosfery - *S. cerevisiae*. Badane folie nie wykazywały efektu antymikrobiologicznego ani w stosunku do analizowanych bakterii ani grzybów mikroskopowych. W przypadku *B. subtilis* odnotowano działanie stymulujące wzrost i sporulację tych bakterii. Zakres tego efektu był uzależniony od zawartości gumy arabskiej w folii, co sugeruje iż jest ona czynnikiem odpowiedzialnym za to zjawisko. Stwierdzono również, że zawartość gumy arabskiej wpływa na zwiększenie przepuszczalności pary wodnej oraz rozpuszczalności folii w wodzie, co dobrze rokuje w kontekście jej potencjalnego wykorzystania w przemyśle rolniczym i spożywczym, np. do ściółkowania upraw lub jako osłony nad roślinami czy materiał osłonek mikrokapsuł.

Czynniki kształtujące jakość biologiczną surowców roślinnych

Jednym z głównych czynników agrotechnicznych determinujących wartość konsumpcyjną i paszową roślin uprawnych jest nawożenie. Jako szczególną formę nawożenia można traktować biofortyfikację, czyli wzbogacanie roślin uprawnych w deficytowe dla człowieka i zwierząt gospodarskich mikroelementy takie jak: żelazo, cynk, mangan, miedź, jod i selen. Ze względu na stwierdzony przez Światową Organizację Zdrowia globalny, bo dotyczący ponad 2 milionów ludzi na świecie niedobór witamin i minerałów w diecie człowieka biofortyfikacja agrotechniczna roślin może być jedną z prostszych i tańszych strategii pozwalających na poprawę jakości biologicznej żywności pochodzenia roślinnego.

Jod jest pierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania metabolizmu człowieka, szczególnie dotyczy to syntezy hormonów tarczycy. Jego niedobór jest główną przyczyną opóźnienia rozwoju, upośledzenia umysłowego, wola endemicznego i innych problemów zdrowotnych określanych terminem zaburzeń związanych z brakiem tego pierwiastka (iodine deficiency disorders). Niedobory jodu mogą być eliminowane na poziomie populacyjnym poprzez wdrażane programy takie jak np. jodowanie soli kuchennej. Nie zawsze jest to jednak bezpieczny sposób uzupełniania diety w ten pierwiastek gdyż nadmierne spożycie soli kuchennej może zaburzać gospodarkę elektrolitową prowadząc do szeregu schorzeń (nadciśnienia tętniczego, miażdżycy, zawałów serca, udarów oraz niektórych chorób nowotworowych). Dlatego rośliny wzbogacone w jod mogą być dla człowieka alternatywnym źródłem tego mikroelementu. Jod nie jest składnikiem pokarmowym roślin, ale mogą go one pobierać ze środowiska i kumulować w tkankach. Nadmierna podaż tego pierwiastka wywołuje jednak efekty

fitotoksyczne, których zakres jest uzależniony przede wszystkim od gatunku rośliny, jej stadium rozwojowego, zastosowanej formy jodu, sposobu aplikacji i stężenia. W literaturze przedmiotu można znaleźć informacje na temat prób biofortyfikacji dojrzałych roślin warzywnych (liściowych i korzeniowych) w jod, ale wykorzystanie do tego celu siewek roślin było nowym podejściem zespołu, w którego badaniach uczestniczyłam (II.A.1.8, II.A.1.9). Argumentami, które przemawiały za słusnością tej decyzji był fakt, że siewki uzyskuje się głównie w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych, ułatwiających precyzyjne dozowanie fizjologicznie efektywnych dawek jodu. Ponadto siewki roślin jadalnych mogą być spożywane na surowo (co ogranicza utratę mikroelementów związaną z procesami obróbki kulinarnej) bądź mogą służyć jako surowiec w produkcji suplementów diety (w przypadku gatunków o niskiej akceptowalności sensorycznej). W porównaniu do dojrzałych roślin charakteryzują się one korzystniejszym składem chemicznym i większą wartością odżywczą co dodatkowo czyni je atrakcyjnym źródłem tego typu związków egzogennych.

W pracy II.A.1.9 oznaczono wpływ dawek jodku potasu KI, aplikowanego do podłoża na etapie kiełkowania nasion, na zawartość wybranych składników mineralnych (w tym jodu) i parametry jakości biologicznej siewek sałaty odmiany Michalina. Istotny wzrost zawartości jodu w siewkach uzyskano dla wszystkich zastosowanych dawek tej soli (0,5, 1,0, 2,5, 5,0 μM). Biofortyfikowane jodem siewki były krótsze niż siewki kontrolne, ale charakteryzowały się podobną biomasa i zawartością chlorofilu. Siewki rosące w obecności 1,0, 2,5 i 5,0 μM KI charakteryzowały się wyższą zawartością potasu oraz obniżoną zawartością sodu i manganu niż siewki kontrolne. W biofortyfikowanych siewkach nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w zawartości wapnia, cynku, żelaza i miedzi, a jedynie przy wyższych stężeniach KI (2,5 i 5,0 μM) odnotowano obniżenie poziomu magnezu.

W pracy II.A.1.8 badano wpływ różnych dawek jodku potasu (KI) zaaplikowanych dwukrotnie na 2 i 4 dniowe siewki sałaty i rzodkiewki. W tych warunkach doświadczalnych analizowano oprócz efektywności biofortyfikacji tym pierwiastkiem także cechy biometryczne i wybrane parametry biologiczne siewek. Najbardziej odpowiednimi do biofortyfikacji dawkami KI w tym układzie doświadczalnym okazały się stężenia tej soli wynoszące 0,075 i 0,15 mg/płytkę, przy których nie stwierdzono istotnych różnic w jakości biologicznej siewek. Siewki z tych prób nie różniły się biomasa ani zawartością chlorofilu od siewek kontrolnych. Natomiast zastosowanie wyższych dawek KI (0,375-1,5 mg) prowadziło do redukcji długości siewek obu gatunków roślin oraz obniżenia niektórych wskaźników biochemicznych. W biofortyfikowanych siewkach sałaty pomimo znaczącego wzrostu zawartości kwasu askorbinowego obserwowano spadek stężenia grup tiolowych i obniżenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej mierzonej metodą DPPH*. Natomiast w siewkach rzodkiewki w analogicznych warunkach nie odnotowano zmian stężenia kwasu askorbinowego, a tylko obniżenie stężenia grup tiolowych, co nie wpłynęło jednak na ich właściwości antyoksydacyjne. Zatem biofortyfikowane niskimi dawkami KI siewki sałaty i rzodkiewki mogą być użytecznym surowcem służącym wzbogacaniu w jod produktów żywnościowych dla człowieka.

Inny podejściem w zakresie bezpiecznego wzbogacenia żywności w jod może być biofortyfikacja roślin nie będących typowym surowcem w produkcji żywności, ale przeznaczonych na paszę dla zwierząt gospodarskich. Zakumulowany tą drogą w tkankach zwierzęcych jod może zostać włączony również do diety człowieka. Mając to na uwadze celem kolejnej pracy było zbadanie efektywności biofortyfikacji jodem pszenżyta ozimego w doświadczeniu polowym (II.D.30). W doświadczeniu tym zastosowano dwie formy chemiczne jodu: KI i KIO_3 , które aplikowano dolistnie i doglebowo. Wyniki tych badań

wykazały, że biofortyfikacja w jod pszenżyta ozimego była efektywna, niezależnie od formy chemicznej jodu i sposobów ich aplikacji. Jednakże, poziom akumulacji jodu i jakość biologiczna roślin zależały od obu czynników. Generalnie, nawożenie doglebowe (w przypadku obu form jodu) powodowało większą akumulację tego pierwiastka w roślinach niż nawożenie dolistne. Rośliny pszenżyta nie wykazywały morfologicznych symptomów toksyczności (chloroz, nekroz itp.) co sugerowało, że zastosowane dawki jodu w obu formach chemicznych nie działały toksycznie. Obserwacje te znalazły potwierdzenie w wynikach analiz biochemicznych (zawartość białka, cukrów redukujących, karotenoidów i chlorofili a i b oraz całkowitej zdolności antyoksydacyjnej mierzonej metodą DPPH^{*}), które wykazały, że zastosowane nawożenie solami jodu nie wpłynęło negatywnie na jakość biologiczną roślin, a wzbogaciło je w jod, pierwiastek deficytowy w paszach.

W swoim dorobku posiadam ponadto współautorskie prace dotyczące zawartości substancji bioaktywnych o właściwościach prozdrowotnych w rzadko wykorzystywanych surowcach roślinnych takich jak pąki, liście i nasiona porzeczki czarnej (II.D.29) oraz zawartości azotanów w roślinach warzywnych i zielarskich pochodzących z upraw ekologicznych, integrowanych i konwencjonalnych (II.D.31). Jestem także współautorką rozdziałów w monografiach tematycznych dotyczących agrotechniki, właściwości biologicznych i możliwości wykorzystania szarłat (*Amaranthus* spp.) (II.D.5), komosy ryżowej (*Chenopodium quinoa* Willd.) (II.D.6), roślin zielarskich w gospodarstwach agroturystycznych (II.D.4) oraz wybranych odmian kukurydzy (II.D.3). Ponadto, w rozdziale monografii pt.: „Agrotechnika roślin uprawnych” przedstawiłam wraz ze współautorami zasady działania nowoopracowanych oraz skomercjalizowanych biosensorów (czujników biologicznych) służących do detekcji czynników infekcyjnych roślin oraz substancji stanowiących zanieczyszczenia środowiska rolniczego (II.D.2).

Wyniki badań naukowych uzyskanych po doktoracie zaprezentowano nie tylko w formie omówionych wyżej prac naukowych ale także na konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym (II.K.1-2 oraz III.B.6-28).

IV. PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWEGO

Od początku mojej działalności na Uczelni opublikowałam 40 oryginalnych prac, w tym 6 stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe, 4 artykuły przeglądowe (w tym jeden włączony do osiągnięcia), 6 rozdziałów w monografiach oraz 30 doniesień i komunikatów naukowych. Jestem także współautorem patentu udzielonego przez Urząd Patentowy RP. Łączna liczba publikacji wynosi więc 80, z tego 69 (około 86%) zostało opublikowanych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora. W czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) opublikowałam 14 prac (łącznie z publikacjami stanowiącymi szczególne osiągnięcie naukowe). Sumaryczna liczba punktów za publikacje w czasopismach ujętych na liście MNiSW (zgodnie z rokiem wydania) wynosi 419 pkt., w tym 227 pkt. za prace z listy JCR oraz 192 pkt. za pozostałe artykuły recenzowane, ponadto 30 pkt. za rozdziały w monografiach naukowych i 12 pkt. za zgłoszenie patentowe. Łączna punktacja za dorobek naukowy wynosi więc 461 pkt., z czego 435 pkt. (około 94%) przypada na dorobek po doktoracie. Sumaryczny Impact Factor według listy JCR (zgodnie z rokiem opublikowania) dla 14 prac wynosi 19,359 (2,067 przed doktoratem) i 17,292 tj. około 89%, po uzyskaniu stopnia doktora, liczba cytowań wg bazy Web of Science (Core Collection) wynosi 161, bez autocytowań 151, a Indeks H= 6.

Prace oryginalne opublikowałam w następujących czasopismach: Ecol. Chem. Eng. A (9), Zesz. Probl. Postęp. Nauk Rol (8), Pol. J. Environ. Stud (5), Acta Biochim. Pol (3), Folia Univ. Agric. Stetin. Agric (2), Roczn. Nauk. Stow. Ekon. Rol. Agrobiz (2), Episteme (Krak.) (2), Pol. J. Food Nutr. Sci. (2), Przem. Chem (2), Chem. Żywn. Nauka Technol. Jakość (1), Dydakt. Ekol. Metrol (1), Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj. (1), Acta Sci Pol. Hortorum Cultus (1), J. Elem. (1), Cell Stress Chaperones (1.), Free Radic. Res. (1), Ecotoxicol. Environ. Saf. (1), LWT- Food Sci. Technol. (1).

Na prośbę redakcji Cell Stress Chaperones, Ecol. Research i wydawnictwa Springer Cham wykonałam recenzję publikacji oraz rozdziału książki złożonych do druku w ww. redakcjach.

Agata Świątko