

**AUTOREFERAT**

przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych

**dr Marcin Grąż**

Zakład Biochemii

Wydział Biologii i Biotechnologii

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Lublin 2017

**SPIS TREŚCI:**

1. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE.....	STR.3
2. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH.....	STR.4
3. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO.....	STR.4
A. TYTUŁ.....	STR.4
B. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ZGŁASZANEGO OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO..	STR.5
C. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA.....	STR.6
WPROWADZENIE.....	STR.6
CEL NAUKOWY WYBRANYCH PRAC.....	STR.8
OPIS OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO.....	STR.8
Zdolność do wzrostu i wydzielania kwasów organicznych w obecności tlenków metali przez grzyby białej zgnilizny drewna .....	STR.8
Ocena kumulacji metali ciężkich i ich wpływu na morfologię grzybni oraz lokalizacja metali w strukturach komórkowych <i>Abortiporus biennis</i> ...	STR.10
Enzymatyczna droga rozkładu kwasu szczawiowego w hodowlach <i>Abortiporus biennis</i> .....	STR.15
Wpływ kwasu szczawiowego na metabolizm <i>Abortiporus biennis</i> .....	STR.17
LITERATURA.....	STR.19
PODSUMOWANIE WYNIKÓW BADAŃ STANOWIĄCYCH TREŚĆ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO PRZEDSTAWIONEGO W POSTĘPOWANIU HABILITACYJNYM ORAZ OMÓWIENIE EWENTUALNEGO ICH WYKORZYSTANIA.....	STR.21
4. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO–BADAWCZYCH.....	STR.22
A. STUDIA I PRACA MAGISTERSKA.....	STR.22
B). PRACA NAUKOWO-BADAWCZA PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA.....	STR.23
C). PRZEBIEG MOJEJ PRACY NAUKOWEJ PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA ORAZ REALIZOWANE AKTUALNIE ZADANIA BADAWCZE.....	STR. 25
5. PLANY NAUKOWE.....	STR. 30
PODSUMOWANIE AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ.....	STR. 31

**dr Marcin Graż**  
Zakład Biochemii  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej  
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin  
graz@umcs.lublin.pl  
tel.: (81) 537-50-51

## **1. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE**

### **Czerwiec 2001 – tytuł magistra biotechnologii**

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie:  
Wydział Biologii i Biotechnologii), Zakład Mikrobiologii Przemysłowej

Tytuł pracy magisterskiej: *„Optymalizacja warunków wytwarzania inwertazy i inulinazy przez *Aspergillus niger* 13/36 w warunkach hodowli wglębnej”*

promotor: Prof. dr hab. Jan Fiedurek

### **Listopad 2005 – stopień doktora nauk biologicznych**

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie:  
Wydział Biologii i Biotechnologii), Zakład Biochemii

**dziedzina: nauki biologiczne , dyscyplina biologia**

Tytuł rozprawy doktorskiej: *„Związki pomiędzy syntezą kwasu szczawiowego a aktywnością enzymatyczną grzybów rozkładających drewno”*

Promotor: Prof. dr hab. Elżbieta Dernałowicz-Malarczyk

## 2. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

**2005 – 2006** – asystent w Zakładzie Biochemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

**2006 – do chwili obecnej** – adiunkt w Zakładzie Biochemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

## 3. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

(wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki [Dziennik Ustaw nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami jak w dz. U. 2005 nr 164, poz. 1365, art. 251; Dz. U. 2011, nr 84, poz. 455])

### A) TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO:

Osiągnięcie naukowe stanowi **cykl 6 publikacji** opublikowanych w latach 2006–2017 pod wspólnym tytułem:

### **„Rola kwasu szczawiowego w mechanizmie tolerancji metali przez *Abortiporus biennis* oraz wpływ na metabolizm grzyba”**

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe to cykl **6 oryginalnych publikacji naukowych**, których sumaryczny *impact factor* (IF), podany zgodnie z rokiem ukazania się publikacji wynosi **12,052** (aktualny sumaryczny IF obowiązujący w roku 2016 wynosi **12,265**). Suma punktów MNiSW podana zgodnie z punktacją obowiązującą w roku opublikowania wynosi **115 pkt**, natomiast zgodnie z obecnie aktualnym ujednoczonym wykazem czasopism punktowanych wynosi **140 pkt**.

Prace badawcze wchodzące w skład osiągnięcia naukowego były w części finansowane z projektu Narodowego Centrum Nauki (OPUS 7, nr umowy: 2014/13/B/NZ9/02106) pt. „*Charakterystyka i znaczenie nowej oksydazy kwasu szczawiowego (OXOAb) w odpowiedzi Abortiporus biennis na obecność metali ciężkich w środowisku wzrostu*”, w którym byłem głównym wykonawcą.

**B) PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ZGŁASZANEGO OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO:**

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego.

Nr	Publikacja, dane bibliograficzne	IF	Punkty MNiSW	IF 2016	Punkty MNiSW 2016
[O1]	Jarosz-Wilkołazka A., Graż* M. (2006) Organic acid production by white rot Basidiomycetes in the presence of metallic oxides. <i>Can. J. Microbiol.</i> 52, 779-785.	1,275	15	1,462	20
[O2]	Graż* M., Jarosz-Wilkołazka A., Pawlikowska-Pawłęga B. (2009) <i>Abortiporus biennis</i> tolerance to insoluble metal oxides: oxalate secretion, oxalate oxidase activity, and mycelial morphology. <i>BioMetals</i> 22, 401–410.	3,172	15	2,183	30
[O3]	Graż* M., Pawlikowska-Pawłęga B., Jarosz-Wilkołazka A. (2011) Growth inhibition and intracellular distribution of Pb ions by the white-rot fungus <i>Abortiporus biennis</i> . <i>Int. Biodeterior. Biodegrad.</i> 65, 124-129.	2,074	25	2,962	30
[O4]	Graż* M., Pawlikowska-Pawłęga B., Jarosz-Wilkołazka A. (2015) Intracellular distribution of cadmium during the growth of <i>Abortiporus biennis</i> on cadmium-amended media <i>Can. J. Microbiol.</i> 61, 545–554.	1,335	20	1,462	20
[O5]	Graż* M., Rachwał K., Zan R., Jarosz-Wilkołazka A. (2016) Oxalic acid degradation by a novel fungal oxalate oxidase from <i>Abortiporus biennis</i> . <i>Acta Biochim. Pol.</i> 63, 3, , 595–600.	1,159	15	1,159	15
[O6]	Graż* M., Jarosz-Wilkołazka A., Janusz G., Mazur A., Wielbo J., Koper P., Żebracki K., Kubik-Komar A. (2017) Transcriptome-based analysis of the saprophytic fungus <i>Abortiporus biennis</i> – response to oxalic acid. <i>Microbiol. Res.</i> 199, 79–88.	3,037	25	3,037	25
<b>Suma punktów:</b>		<b>12,052</b>	<b>115</b>	<b>12,265</b>	<b>140</b>

\* - autor korespondencyjny

## C) OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW

### WPROWADZENIE:

Tworzący drewno kompleks ligninocelulozy stanowi największy rezerwuár węgla w przyrodzie. Główne komponenty ściany komórkowej roślin tworzą trudny do biologicznego rozkładu biopolimer, głównie ze względu na aromatyczny charakter obecnego w nim kompleksu ligniny. Najefektywniej kompleks ligninocelulozy degradują grzyby należące do klasy Basidiomycota. Na podstawie zmian stwierdzanych w drewnie zainfekowanym przez grzyby możemy wyróżnić dwie grupy ekologiczne: grzyby powodujące białą, oraz grzyby wywołujące brunatną zgniliznę drewna. Jedynie grzyby białej zgnilizny drewna są w stanie mineralizować wszystkie składniki ściany komórkowej roślin. Grzyby brunatnej zgnilizny rozkładają głównie komponent celulozowy i hemicelulozowy, ligninę zostawiając w stanie zmodyfikowanym lub nienaruszonym (Bugg i wsp., 2011, Cragg i wsp., 2015). Gatunek *Abortiporus biennis*, badany w ramach prowadzonych przeze mnie doświadczeń, należy do ekologicznej grupy grzybów wywołujących białą zgniliznę drewna. W procesie rozkładu drewna zaangażowane są liczne enzymy, które można podzielić na enzymy bezpośrednio działające na komponenty ściany komórkowej roślin oraz na enzymy pośrednio zaangażowane w proces rozkładu (Leonowicz i wsp., 1999; Lundell i wsp., 2010). Kompleks celulozowy drewna atakowany jest w obu grupach ekologicznych grzybów przez synergistycznie działające egzo- i endo-celulazy oraz hemicelulazy (Baldrian i Valaskova, 2008). Ważnymi i różnicującymi obie grupy ekologiczne enzymami są enzymy utleniające, które działają bezpośrednio na ligninę. Do głównych enzymów lignolitycznych grzybów białej zgnilizny drewna zaliczamy lakazę (EC 1.10.3.2), peroksydazę manganozależną (MnP, EC 1.11.1.13), peroksydazę ligninową (LiP, EC 1.11.1.14), peroksydazę hybrydową (VP, EC 1.11.1.16) i peroksydazę DyP (DyP, EC 1.11.1.19). Enzymy zaangażowane pośrednio w proces rozkładu ligniny dostarczają związków niezbędnych do prowadzenia efektywnego rozkładu np. różnego typu oksydazy są źródłem nadtlenu wodoru, koniecznego do działania peroksydaz (Janusz i wsp., 2017). W proces enzymatycznego rozkładu oraz na etapie poprzedzającym enzymatyczną degradację kompleksu ligninocelulozy, zaangażowane są związki niskocząsteczkowe. Ich rolą jest m. in. zwiększenie porowatości tkanek i tym samym przygotowanie struktury drewna do etapu enzymatycznego. Do najważniejszych związków niskocząsteczkowych, które biorą udział w metabolizmie grzybów zaliczyć możemy: nieorganiczne jony metali, reaktywne formy tlenu, substancje fenolowe i kwasy organiczne

(Arantes i Milagres, 2007; Nousiainen i wsp., 2014). **Kwas szczawiowy** może być uznany za najważniejszy i najczęściej stwierdzany w hodowlach grzybowych kwas organiczny (Dutton i Evans, 1996). Jest on potencjalnie zaangażowany zarówno w procesy nieenzymatyczne, jak i pośrednio w etap enzymatycznego rozkładu drewna. Kwas szczawiowy uczestniczy w stabilizowaniu jonu  $Mn^{3+}$  powstającego w cyklu katalitycznym peroksydazy MnP, chelatując go i umożliwiając działanie na struktury drewna w pewnej odległości od grzybni (Hofrichter 2002). Wykazano również korelacje pomiędzy aktywnością poszczególnych enzymów ligninolitycznych oraz stężeniem kwasu szczawiowego w podłożu hodowlanym grzybów białej zgnilizny drewna (Shimada i wsp., 1997). Kwas szczawiowy pełni ponadto ważną rolę w procesie chelatowania jonów metali takich jak wapń, mangan, kadm, oraz ołów przez grzyby, stanowiąc skuteczny sposób unieruchamiania metali ciężkich w skażonych warunkach (Gadd, 2007). W połączeniu z wydajnym systemem rozkładu związków aromatycznych, *Abortiporus biennis* może pełnić ważną rolę w procesach bioremediacji.

Grzyby znane są ze swoich zdolności do wzrostu w środowisku w obecności nawet wysokich stężeń metali ciężkich, które mogą być wydajnie kumulowane w grzybni. Kumulacja ta może mieć charakter **biosorbpcji** jonów metali do struktur ścian komórkowych, poprzez mechanizmy o charakterze fizykochemicznym, lub **bioakumulacji** w komórce grzybni. Proces bioakumulacji ma charakter aktywny i wymaga nakładów energii metabolicznej (Gadd, 2007). Niektóre z metali ciężkich obecnych w środowisku wzrostu grzybni są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania grzybowego metabolizmu. Zasadniczą rolę odgrywa stężenie metalu, ponieważ nieznaczny wzrost stężenia metali może zasadniczo zahamować wzrost grzybni, podczas gdy obecność metali w śladowym stężeniu jest często niezbędna do jej prawidłowego wzrostu i funkcjonowania (Baldrian, 2003). Do metali o istotnym znaczeniu dla funkcjonowania grzybni zaliczamy jony miedzi, manganu, żelaza i cynku. Metale te stanowią istotny element w centrach aktywnych enzymów np. miedź występuje w centrum aktywnym lakazy, istotnego enzymu grzybowego z punktu widzenia rozkładu kompleksu ligninocelulozowego, żelazo w centrum aktywnym peroksydaz grzybowych np. peroksydazy MnP (Janusz i wsp., 2017). Jony manganu występują w centrum aktywnym dekarboksylazy i oksydazy kwasu szczawiowego, enzymów rozkładających kwas szczawiowy. Jeszcze inna rola, którą pełnią jony manganu, to wspomniana już funkcja  $Mn^{3+}$  powstającego w cyklu katalitycznym MnP jako niskocząsteczkowy czynnik, który bierze udział w procesie rozkładu drewna. Jednym z efektywnych form radzenia sobie z dużymi stężeniami metali ciężkich w środowisku wzrostu grzybni, może być wydzielanie kwasu

szczawiowego. Może on tworzyć rozpuszczalne bądź nierozpuszczalne kompleksy z metalami, co przyczynia się do tolerowania wysokich stężeń metali ciężkich przez grzybnię (Gadd i wsp., 2014).

#### CEL NAUKOWY WYBRANYCH PRAC

Badania, których rezultaty zaprezentowano w publikacjach składających się na osiągnięcie habilitacyjne, dotyczyły określenia roli kwasu szczawiowego w procesach usuwania metali ze środowiska wzrostu, poznania zmian jakie obecność metali wywołuje w komórkach grzybni oraz wpływu jaki kwas szczawiowy wywiera na cały metabolizm saprofitycznego grzyba *Abortiporus biennis*, zaliczanego do grzybów białej zgnilizny drewna.

Badania obejmowały następujące zagadnienia

w nawiasach podano numer publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

1. zdolność do wzrostu i wydzielania kwasów organicznych w obecności tlenków metali przez grzyby białej zgnilizny drewna [O1],
2. ocena kumulacji metali ciężkich i ich wpływu na morfologię grzybni oraz lokalizacja metali w strukturach komórkowych *Abortiporus biennis* [O2,O3,O4],
3. enzymatyczna droga rozkładu kwasu szczawiowego w hodowlach *Abortiporus biennis* [O5],
4. wpływ kwasu szczawiowego na metabolizm *Abortiporus biennis* [O6].

#### OPIS OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

##### **Ad. 1 Zdolność do wzrostu i wydzielania kwasów organicznych w obecności tlenków metali przez grzyby białej zgnilizny drewna**

Zdobyte w trakcie przygotowywania rozprawy doktorskiej doświadczenia, związane z badaniami nad gromadzeniem kwasu szczawiowego w podłożach grzybów wywołujących zgniliznę drewna, oraz zaobserwowanie dużego potencjału grzybów w procesach bioremediacji, skierowało moje zainteresowania w kierunku roli jaką kwas szczawiowy pełni w procesach usuwania metali.

Ocenę udziału kwasu szczawiowego w procesie tolerowania przez grzyby obecności wybranych metali w środowisku, rozpocząłem badaniami mającymi na celu ocenę zdolności do wzrostu i syntezy kwasów organicznych przez wybrane szczepy grzybowe, rosnące na



podłożach wzbogaconych dodatkiem tlenków metali (ZnO, CaO i Cu<sub>2</sub>O). Przeanalizowano 28 gatunków zaliczanych do grzybów powodujących białą zgniliznę drewna. Oceniając toksyczność badanych tlenków metali, przyjmując jako kryterium hamowanie wzrostu grzybni w ich obecności, za najbardziej toksyczny uznano tlenek miedzi (I). Dodatek Cu<sub>2</sub>O do podłoża powodował całkowite zahamowanie wzrostu 7 spośród badanych szczepów grzybów. Dodatek CaO hamował całkowicie wzrost 3 szczepów, natomiast na podłożach z dodatkiem ZnO wzrost wykazywały wszystkie badane szczepy, ale w różnym zakresie. Najbardziej wrażliwymi na obecność metali w środowisku wzrostu spośród badanych grzybów okazały się *Clitocybula dusenii*, *Coprinus micaceus*, *Dichomitus albidofucus*, *Diplomitoporus crustulinus*, *Kuehneromyces mutabilis*, *Pleurotus ostreatus*. Wymienione grzyby nie wykazywały wzrostu na podłożach z dodatkiem tlenków metali, lub ich wzrost był hamowany o około 75% w porównaniu ze wzrostem obserwowanym na podłożach kontrolnych, bez dodatku metalu. Kilka badanych grzybów wykazywało stymulację wzrostu w obecności metalu w podłożu; były to *Ganoderma applanatum*, *Agrocybe aegerita*, *Agrocybe cylindracea*, *Cerrena unicolor*, *Pholiota nameko*, *Pleurotus cystidiosus*, *Heterobasidion annosum*.

Ocena zdolności grzybów do rozpuszczania użytych w doświadczeniu tlenków metali, polegała na obserwacji przejaśnień pojawiających się w trakcie wzrostu grzybni na podłożu. Strefa przejaśnienia na podłożach wzbogaconych nierozpuszczalnym tlenkiem metalu, pojawiająca się w trakcie hodowli, świadczy o zdolności grzybni do przeprowadzania tlenku metalu w formę rozpuszczalną. Zaobserwowane strefy przejaśnień miały różny zakres, w zależności od grzybni oraz badanego tlenku. Najwięcej spośród badanych grzybów rozpuszczało znajdujący się w podłożu wzrostowym tlenek cynku (ZnO). Najmniej przejaśnień obserwowano w przypadku dodatku do podłoża Cu<sub>2</sub>O. Nie obserwowano korelacji pomiędzy stopniem wzrostu grzybni, a zdolnością grzyba do tworzenia stref przejaśnień. W przypadku kilku gatunków grzybów obserwowano bardzo dobry lub dobry wzrost w obecności tlenków metali, lecz nie wykazano tworzenia przejaśnień w podłożu.

Kolejnym badanym parametrem było stężenie kwasów organicznych obecnych w podłożu po wzroście grzybni. Ilość wydzielanych do podłoża kwasów organicznych sprawdzono dla 18 szczepów grzybowych. Pominięto grzyby, które nie wykazywały wzrostu, lub wykazywały tylko minimalny wzrost na płytkach wzbogacanych tlenkiem metalu (5 szczepów) oraz grzyby, które nie tworzyły przejaśnień w podłożu w czasie prowadzenia hodowli.

Uzyskane w wyniku przeprowadzonych doświadczeń obserwacje pozwoliły podzielić badane grzyby na trzy grupy. Pierwsza grupa to gatunki wrażliwe na obecność metali w podłożu, które charakteryzowały się słabym wzrostem na podłożu wzbogaconym badanymi tlenkami metalu. Grupa druga, do której zaliczono grzyby dobrze rosnące w obecności metali w podłożu, to gatunki wśród których nie dało się zaobserwować tworzenia stref przejaśnienia świadczących o rozpuszczeniu tlenku metalu. Do najliczniejszej grupy trzeciej, zaliczono gatunki wydzielające do podłoża kwasy organiczne. W badanych warunkach hodowli stwierdzono obecność kwasów szczawiowego, mrówkowego i jabłkowego. Kwas szczawiowy był dominującym kwasem organicznym w badanych podłożach a zakres stężeń tego kwasu w badanych podłożach różnił się znacznie w zależności od gatunku grzyba i mieścił się w przedziale od 0,03 mM do 1,17 mM.

Grzyb *Abortiporus biennis* zaliczony został do grupy organizmów zdolnych do dobrego wzrostu na podłożach z dodatkiem tlenków metali oraz tworzenia stref przejaśnień, świadczących o rozpuszczeniu tlenków metali. *Abortiporus biennis* wykazywał wysoką tolerancję w stosunku do wszystkich trzech testowanych tlenków metali. Wzrost *A. biennis* na podłożach z dodatkiem ZnO był porównywalny ze wzrostem na podłożu kontrolnym. Dodatek tlenków CaO i Cu<sub>2</sub>O, powodował zahamowanie wzrostu o 40% w porównaniu do wzrostu obserwowanego na podłożu kontrolnym. Po wzroście *A. biennis* wykazano w podłożach obecność tylko kwasu szczawiowego w stężeniu od 0,1 mM do 0,14 mM, w zależności od obecnego w podłożu tlenku metalu.

***Efektom przeprowadzonych doświadczeń zaprezentowanych w pracy [O1] jest wykazanie po raz pierwszy zdolności niektórych z badanych grzybów do syntezy kwasu szczawiowego, jak również wykazanie udziału kwasu szczawiowego w procesie rozpuszczania obecnych w podłożu tlenków metali.***

## **Ad. 2 Ocena kumulacji metali ciężkich i ich wpływu na morfologię grzybni oraz lokalizacja metali w strukturach komórkowych *Abortiporus biennis***

Wykazany w poprzednich doświadczeniach wysoki stopień tolerancji *Abortiporus biennis* na obecność metali ciężkich w podłożu wzrostowym, skłonił mnie do rozszerzenia badań o kolejne metale oraz zwrócenia uwagi na zmiany w morfologii i strukturach komórkowych grzybni, zachodzące pod wpływem dodatku tlenków metali do podłoża. W trakcie przeprowadzonych doświadczeń nad stopniem kumulacji jonów metali w grzybni

*A. biennis*, ich lokalizacji w strukturach wewnątrzkomórkowych oraz wpływu na morfologię strzępek, badałem wzrost *Abortiporus biennis* na podłożach wzbogaconych dodatkiem nierozpuszczalnych tlenków metali ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{MnO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{CuFe}_2\text{O}_4\text{Zn}$ ,  $\text{CdO}$ ) w stężeniach wyższych niż poprzednio stosowane (10 mM, 20 mM i 30 mM).

Wraz ze zwiększającym się stężeniem metalu w podłożu obserwowano zwiększone zahamowanie wzrostu grzybni. Przyjmując zdolność do wzrostu jako kryterium dla określenia tolerancji grzybni na obecność danego metalu ciężkiego w środowisku, najbardziej toksyczne spośród badanych okazały się jony kadmu. Wykazano znaczne zahamowanie wzrostu grzybni w obecności jonów kadmu już przy 10 mM stężeniu  $\text{CdO}$  w podłożu, oraz całkowite zahamowanie wzrostu grzybni przy wyższych stężeniach  $\text{CdO}$ . Ograniczony wzrost grzybni *A. biennis* obserwowano w obecności tlenków  $\text{ZnO}$ ,  $\text{Cu}_2\text{O}$  i  $\text{MnO}_2$ . Obecność w podłożu tlenków  $\text{Al}_2\text{O}_3$  oraz  $\text{CuFe}_2\text{O}_4\text{Zn}$ , nie hamowała wzrostu grzybni *A. biennis*.

Kolejnym ocenianym parametrem była zdolność rosnącej grzybni *A. biennis* do rozpuszczania tlenków metali ciężkich obecnych w podłożu oraz monitorowanie związanego z tym wydzielania przez grzybnię kwasu szczawiowego. Tworzenie soli szczawianowych z metalami może tłumaczyć powstawanie przejaśnień na podłożach zawierających tlenki metali. Na podłożach zawierających 10 mM  $\text{CdO}$  obszar widocznych przejaśnień pokrywał się ze strefą wzrostu grzybni. Przejaśnienia wykraczające swoją średnicą poza strefę wzrostu grzybni *A. biennis* stwierdzono na podłożach zawierających  $\text{ZnO}$  oraz  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Na podłożach zawierających pozostałe badane tlenki ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{MnO}_2$ ,  $\text{CuFe}_2\text{O}_4\text{Zn}$ ), nie obserwowano przejaśnień lub obserwowano tylko niewielkie przejaśnienia w centralnym obszarze pod grzybnią, tak jak na przykład w przypadku  $\text{MnO}_2$ . Podwyższone stężenie kwasu szczawiowego w porównaniu z podłożami kontrolnymi, stwierdzono we wszystkich podłożach wzbogaconych metalami, z wyjątkiem podłoża z dodatkiem  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Gromadzenie kwasu szczawiowego w hodowlach zawierających tlenki  $\text{Cu}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{CdO}$  było skorelowane z obserwowanymi przejaśnieniami podłoża hodowlanych, świadczącymi o rozpuszczaniu tlenków metali. Jedynie w przypadku  $\text{CuFe}_2\text{O}_4\text{Zn}$  pomimo wzrostu stężenia szczawianu, nie obserwowano rozpuszczania tlenku dodanego do podłoża. Obserwowane przejaśnienia, świadczące o rozpuszczaniu stosowanych jako dodatek do podłoża tlenków, mogą wskazywać na udział w tym procesie kwasu szczawiowego.

Grzybnia może wydajnie kumulować metale ciężkie. Kumulacja może mieć charakter biosorbpcji jonów metali do struktur ścian komórkowych poprzez mechanizmy o charakterze fizykochemicznym, lub bioakumulacji w komórce grzybni, która ma charakter aktywny

i wymaga nakładów energii metabolicznej. Badania przeprowadzone w celu określenia stopnia akumulacji metali przez *A. biennis* wykazały różny stopień zawartości metali w grzybni, w zależności od zastosowanego stężenia metalu w podłożu wzrostowym. Stwierdzono, że w przypadku 10 mM dodatku tlenków metali do podłoża, zawartość jonów poszczególnych metali w grzybni przedstawiała się w następującej kolejności: w najwyższym stężeniu obecne były jony  $\text{Cu}^{1+}$  pochodzące z  $\text{Cu}_2\text{O}$ , następnie jony  $\text{Mn}^{4+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  oraz  $\text{Al}^{2+}$ . W przypadku wzrostu w obecności tlenków metali o stężeniu 30 mM, zawartość metali w badanej grzybni przedstawiała się w następującej kolejności: najwyższe stężenie stwierdzono dla jonów  $\text{Zn}^{2+}$ , następnie  $\text{Cu}^{1+}$ ,  $\text{Mn}^{4+}$  oraz  $\text{Al}^{2+}$ . Tlenek  $\text{CdO}$  w stężeniu 30 mM nie był badany, ponieważ w tym stężeniu powodował całkowite zahamowanie wzrostu grzybni *A. biennis*.

Obecność tlenków metali w trakcie wzrostu grzybni *A. biennis* wpływał znacząco na morfologię strzępek, co zostało wykazane w trakcie przeprowadzonych obserwacji mikroskopowych. Wykazano niekorzystne zmiany morfologiczne grzybni *A. biennis* pod wpływem tlenków metali obecnych w środowisku wzrostu. Obserwowane zmiany wykazywały korelację wraz ze zwiększającymi się stężeniami metalu w podłożu. Niekorzystny wpływ metali na morfologię grzybni obserwowany był przede wszystkim jako większą obecność rozgałęzionych strzępek, pogrubienie ściany komórkowej oraz występowanie nieregularnych przegród wewnątrz strzępek i wzrost liczby widocznych pod mikroskopem spor.

Na tym etapie prac dokonano również istotnej obserwacji, dotyczącej metabolizmu kwasu szczawiowego przez grzybnię *A. biennis*. Stwierdzono oksydacyjną drogę rozkładu kwasu szczawiowego, prowadzącą do powstania nadtlenu wodoru i dwutlenku węgla, katalizowaną przez oksydazę kwasu szczawiowego (EC 1.2.3.4). Nie wykazano natomiast typowej dla grzybów białej zgnilizny drewna aktywności dekarboksylazy kwasu szczawiowego (EC 4.1.1.2), której produktami są kwas mrówkowy oraz dwutlenek węgla. Stwierdzona w grzybni *A. biennis* aktywność **oksydazy kwasu szczawiowego** wykazywała zróżnicowanie, w zależności od obecnych w środowisku wzrostu grzybni metali. Najwyższą aktywność oksydazy kwasu szczawiowego stwierdzono na podłożach zawierających  $\text{Mn}_2\text{O}$  i  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Najniższą aktywność enzymu zaobserwowano na podłożach z dodatkiem  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , natomiast w grzybni z dodatkiem  $\text{CdO}$  nie stwierdzono aktywności oksydazy kwasu szczawiowego.

*Podsumowując, w wyniku przeprowadzonych doświadczeń przedstawionych w pracy [O2], wykazano zdolność *Abortiporus biennis* do wzrostu w obecności tlenków metali ciężkich, jak również wykazano zdolność grzybni do akumulacji metali. Zaobserwowano negatywny wpływ jaki metale ciężkie wywierają na rosnącą grzybnię. Po raz pierwszy wykazano i opisano obecność w grzybni *A. biennis* aktywności oksydazy kwasu szczawiowego, co stanowi unikalną cechę wśród grzybów białej zgnilizny drewna.*

W kolejnej pracy wchodzącej w skład osiągnięcia zbadano zdolność *A. biennis* do akumulacji jonów  $Pb^{2+}$ . Zanieczyszczenia jonami ołowiu stanowią poważny problem w środowisku, upośledzając przebieg wielu procesów biologicznych, w tym także rozkład materii organicznej w glebie m.in. celulozy. Ołów nie jest wykorzystywany ani transformowany przez organizmy żywe i może ulegać stopniowej kumulacji w organizmach, szczególnie na wyższych szczeblach łańcucha pokarmowego. Grzyby, znane ze zdolności do akumulacji metali, wykształciły mechanizmy warunkujące oporność i tolerancję na metale ciężkie. Rozpatrując biomasę grzybową jako narzędzie stosowane do usuwania zanieczyszczeń ołowiem, ważne jest poznanie dystrybucji metalu we wnętrzu grzybni, w celu jej efektywnego wykorzystywania. Kolejny etap prac obejmował doświadczenia dotyczące wzrostu *A. biennis* i wewnątrzkomórkowej lokalizacji jonów ołowiu w komórkach grzybni, rosnącej w obecności tlenku ołowiu ( $PbO$ ). Obserwacje wykonane z użyciem elektronowego mikroskopu transmisyjnego, wykazały wakuolizację przestrzeni periplazmatycznej, jak również wnętrza cytoplazmy komórek grzybni rosnącej w obecności  $PbO$ . Stwierdzono również obecność elektronowo gęstego materiału w pobliżu błony komórkowej oraz w pobliżu błon wakuolarnych, jak również we wnętrzu cytoplazmy. Aglomeraty elektronowo-dodatnich złogów zaobserwowano ponadto w pobliżu struktur retikulum endoplazmatycznego oraz w sąsiedztwie parentosomu. Poza stwierdzeniem zmian w strukturze wnętrza komórek grzybni zachodzących pod wpływem  $PbO$ , dokonano analizy lokalizacji jonów  $Pb^{2+}$  w strukturach komórkowych *A. biennis*. Jony ołowiu wykazano w różnych obszarach komórki *A. biennis*. Obecne były głównie w cytoplazmie, jak również w pobliżu dużych wakuoli oraz pomiędzy małymi wakuolami i w ścianie komórkowej grzybni.

Obecność  $PbO$  w podłożu wzrostowym powodowała zahamowanie wzrostu grzybni. Redukcja wzrostu grzybni rosnącej w obecności 10 mM stężenia  $PbO$ , w porównaniu z grzybnią kontrolną, wynosiła 15%, dochodząc nawet do 85% w obecności 30 mM  $PbO$ . Badając akumulację jonów  $Pb^{2+}$  w grzybni stwierdzono wyższe stężenie jonów ołowiu w grzybni rosnącej na podłożu z dodatkiem 10 mM  $PbO$ , niż w grzybni izolowanej z podłoża

zawierającego 30 mM tlenek ołowiu. Należy podkreślić, że zdolność do bioakumulacji metalu nie musi oznaczać w przypadku grzybów toksyczności metalu. Może to wskazywać u *A. biennis* na większą rolę procesów aktywnych, wymagających energii metabolicznej w procesach ochronnych, zapobiegających bioakumulacji ołowiu przez grzybnię. Ze względu na potencjalny udział kwasów organicznych w procesy rozpuszczania tlenków metali określono ilościowo ich zawartość w podłożach wzrostowych. Kwas szczawiowy był jedynym stwierdzonym kwasem organicznym w podłożu. Jego stężenie w podłożach zawierających PbO było niższe niż w podłożu kontrolnym. Jednocześnie należy zaznaczyć, że nie zaobserwowano stref rozpuszczania PbO w trakcie wzrostu *A. biennis*.

***Wymiernymi efektami przedstawionych w pracy [O3] doświadczeń było wykazanie lokalizacji jonów ołowiu w komórce A. biennis oraz wpływu PbO na ultrastrukturę komórek grzybni. Wykazano zdolność A. biennis do akumulacji jonów ołowiu oraz zmniejszone wydzielania do podłoża kwasu szczawiowego w podłożach zawierających PbO.***

W kolejnym etapie badań skupiłem się na poznaniu lokalizacji jonów kadmu w grzybni *Abortiporus biennis*. Kadm jest pierwiastkiem, który łatwo podlega bioakumulacji i wykazuje wysoki stopień toksyczności dla organizmów żywych. Charakteryzuje się długim okresem biologicznego półtrwania oraz wysoką mobilnością pomiędzy glebą a roślinami. Kadm może zaburzać w organizmach gospodarkę metalami ważnymi z punktu widzenia metabolizmu oraz negatywnie wpływać na procesy mikrobiologiczne w środowisku. Ze względu na wykazany w poprzednich badaniach toksyczny efekt jonów kadmu na wzrost i metabolizm *A. biennis*, hodowle w tej części badań prowadzono z dodatkiem 0,5 mM i 1 mM CdO do podłoża wzrostowego. Przeprowadzona obserwacja struktur wewnątrzkomórkowych z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego, wykazała w komórkach rosnących na podłożach zawierających CdO obecność gęstszej cytoplazmy, w porównaniu z komórkami z grzybni kontrolnej rosnącej bez dodatku CdO. Ponadto, w komórkach rosnących z dodatkiem CdO, wykazano występowanie regionów o obniżonej gęstości elektronowej w przestrzeniach międzycytoplazmatycznych oraz powiększony region periplazmatyczny. Wykazano ponadto wakuolizację regionu periplazmatycznego oraz cytoplazmy komórki. Obserwowane basidiospory zawierały skupiska kropli lipidowych oraz małych wakuoli w przestrzeni periplazmatycznej. Dokonano również analizy lokalizacji jonów Cd<sup>2+</sup> w strukturach komórkowych *A. biennis*. Obecność kadmu stwierdzono w różnych regionach obserwowanych komórek. Kadm obecny był w cytoplazmie komórek, basidiospor oraz chlamydospor. Lokalizację kadmu wykazano w pobliżu małych wakuol w komórkach

*A. biennis*, które wykazywały wyraźnie pogrubione ściany komórkowe. Wykazany wcześniej toksyczny efekt kadmu, wyrażony hamowaniem wzrostu grzybni, został potwierdzony również dla stosowanych w tym doświadczeniu mniejszych stężeń CdO. Wzrost grzybni *A. biennis* w porównaniu z hodowlami kontrolnymi ulegał zahamowaniu o 30% w przypadku podłoży z 0,5 mM CdO i o 75% dla podłoży z 1 mM CdO. Podobnie jak dla PbO, w badanych podłożach z dodatkiem CdO, wykazano zmniejszone w porównaniu z podłożem kontrolnym stężenie kwasu szczawowego.

Czynnikiem wpływającym na mobilność jonów metalu jest wartość pH środowiska. Kolejnym parametrem sprawdzonym w toku prowadzonych doświadczeń, był wpływ wartości pH podłoża na stopień akumulacji kadmu w grzybni. Największe stężenie jonów kadmu wykazano, gdy wyjściowa wartość pH podłoża wynosiła 6. W trakcie wzrostu grzybni wartość pH podłoży z dodatkiem CdO zbliżało się do wartości 4,5 i było niższe niż stwierdzane w podłożach kontrolnych. Należy zaznaczyć, że początkowa wartość pH podłoża wzrostowego nie miała wpływu na przyrost biomasy *A. biennis*.

*Efektom przeprowadzonych doświadczeń zaprezentowanych w pracy [O4] jest wykazanie zmian w komórkach grzybni pod wpływem jonów kadmu oraz wykazanie lokalizacji jonów kadmu w komórce i jego wpływu na ultrastrukturę komórki.*

### **Ad. 3 Enzymatyczna droga rozkładu kwasu szczawowego w hodowlach *Abortiporus biennis***

Ze względu na swoją toksyczność oraz specyficzną funkcję, stężenie kwasu szczawowego jest aktywnie regulowane przez grzybnię. Istniejące w przyrodzie enzymatyczne drogi rozkładu kwasu szczawowego obejmują zasadniczo cztery aktywności katalityczne, przypisywane poszczególnym królestwom organizmów (Svedružić i wsp, 2005, Mäkelä i wsp., 2010, Gibson i wsp., 2016):

1. typowy dla grzybów szlak dekarboksylacji cząsteczki kwasu szczawowego z udziałem **dekarboksylazy kwasu szczawowego** (ODC, EC 4.1.1.2),

2. stwierdzaną w komórkach bakteryjnych dekarboksylację aktywowanej cząsteczki kwasu szczawowego jaką jest szczawianylo-CoA, w reakcji katalizowanej przez **dekarboksylazę szczawianylo-CoA** (EC 4.1.1.8), oraz reakcję rozkładu szczawianu do dwóch cząsteczek CO<sub>2</sub> katalizowaną przez **TPP-zależną oksydoreduktazę kwasu szczawowego**.

3. typowe dla organizmów roślinnych utlenianie cząsteczki kwasu szczawowego do  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  w reakcji katalizowanej przez **oksydazę kwasu szczawowego** (OXO, EC 1.2.3.4).

Ważnym aspektem prowadzonych badań było poznanie enzymatycznej drogi rozkładu kwasu szczawowego w hodowlach *Abortiporus biennis*. Dane literaturowe podają, że główna enzymatyczna droga rozkładu kwasu szczawowego przez grzyby należące do ekologicznej grupy białej zgnilizny drewna, odbywa się poprzez reakcję dekarboksylacji do kwasu mrówkowego i dwutlenku węgla (Mäkelä i wsp., 2002, 2009). W wyniku przeprowadzonych badań [O2] wykazano, że w grzybni *A. biennis* rozkład kwasu szczawowego przebiega innym szlakiem. Za rozkład kwasu szczawowego w hodowlach *A. biennis* odpowiada oksydaza kwasu szczawowego, enzym z klasy oksydoreduktaz (EC 1.2.3.4). Produktem reakcji rozkładu kwasu szczawowego przez oksydazę kwasu szczawowego jest nadtlenuk wodoru oraz dwutlenek węgla. Po dodaniu kwasu szczawowego do hodowli *A. biennis*, w celu indukcji wytwarzania enzymów katabolizmu szczawianów, zaobserwowano wzrost stężenia nadtlenuku wodoru w podłożu hodowlanym. Nie było to skorelowane z obecnością w podłożu wzrostowym kwasu mrówkowego, który jest produktem dekarboksylacji kwasu szczawowego. Nadtlenuk wodoru jest istotnym związkiem w metabolizmie ligninocelulozy, ze względu m.in. na udział w cyklu katalitycznym licznych peroksydaz. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że oksydaza kwasu szczawowego z *A. biennis* jest enzymem wewnątrzkomórkowym i ma charakter indukcyjny. Nie wykazano zewnątrzkomórkowej aktywności oksydazy kwasu szczawowego ani dekarboksylazy kwasu szczawowego u *A. biennis*. Zaobserwowano, że do indukcji oksydazy kwasu szczawowego w hodowlach *A. biennis* niezbędne jest jedynie obniżenie wartości pH podłoża wzrostowego. Enzym nie jest indukowany przez substrat, jeżeli nie ulegnie obniżeniu wartość pH, co potwierdzono stosując dodatek szczawianu sodu. Oksydaza kwasu szczawowego z *A. biennis* wykazuje specyficzną substratową dla kwasu szczawowego. Wartość  $K_m$  oczyszczonego metodami chromatograficznymi enzymu dla kwasu szczawowego ustalono na  $1,5 \times 10^{-2}$  M a wartość  $V_{max}$  na  $0,03 \text{ mol min}^{-1}$ . Otrzymany i oczyszczony z grzybni *A. biennis* enzym wykazywał aktywność enzymatyczną tylko w niskim zakresie wartości pH. W środowisku o wartości pH powyżej 4 stwierdzono całkowite zahamowanie aktywności enzymatycznej oksydazy kwasu szczawowego z *A. biennis*. Optimum temperatury ustalono na  $60^\circ\text{C}$ . Masę cząsteczkową oszacowano na 58 kDa. Uzyskane wyniki wykazały, że oksydaza kwasu szczawowego izolowana z grzybni *A. biennis* wykazuje



odmienne właściwości niż znane do tej pory enzymy katalizujące reakcje rozkładu kwasu szczawiowego.

*Wymiernym efektem przeprowadzonych analiz zaprezentowanych w pracy [O5] jest pierwsza charakterystyka grzybowej oksydazy kwasu szczawiowego pochodzącej z grzybni *Abortiporus biennis*.*

#### **Ad. 4 Wpływ kwasu szczawiowego na metabolizm *Abortiporus biennis***

W kolejnej pracy podjąłem próbę odpowiedzi na pytanie jak dodatek kwasu szczawiowego do podłoża wzrostowego wpływa na metabolizm *A. biennis*, ze szczególnym uwzględnieniem metabolizmu kompleksu ligninocelulozy. W tym celu obserwowano zmiany na poziomie transkrypcji, dokonując analizy porównawczej całego transkryptomu grzyba *A. biennis* w dwóch wariantach hodowli, indukowanej kwasem szczawiowym oraz nieindukowanej hodowli kontrolnej. Wykazano, że pod wpływem kwasu szczawiowego poziom ekspresji 82 genów zmieniał się znacząco. Pośród nich, ekspresja 18 genów zwiększała się, a 64 genów zmniejszała się znacząco. Z danych literaturowych wynika, że stężenie kwasu szczawiowego wpływa na procesy degradacji kompleksu ligninocelulozy. Stężenie kwasu szczawiowego wpływa na syntezę i aktywność lakazy i MnP (Shimada i wsp., 1997). W wyniku przeprowadzonych analiz potwierdzono dla *A. biennis* ekspresję 11 genów dla lakazy i 3 genów dla MnP oraz transkrypty adnotowane do peroksydazy ligninowej (LiP). Wykazano również po raz pierwszy dla *A. biennis* ekspresję genów dla peroksydazy hybrydowej (VP), chloroperoksydazy, oraz peroksydazy DyP. Ekspresja większości genów dla enzymów ligninolitycznych *A. biennis* nie była wcale lub była tylko nieznacznie regulowana poprzez dodatek kwasu szczawiowego. Jedynie dla genu kodującego peroksydazę VP wykazano znacząco zmniejszoną ekspresję pod wpływem kwasu szczawiowego. Ekspresja genów dla celulaz i hemicelulaz u *A. biennis* ulegała ogólnie podwyższeniu pod wpływem kwasu szczawiowego. Najwyraźniej wzrost ekspresji został zanotowany dla endo-1,4- $\beta$ -ksylanazy. Transkrypty, odpowiednio dwóch genów kodujących endo-1,3- $\beta$ -glukozydazy i jednego genu dla egzoglukanazy, również występowały w większej liczbie w grzybni po indukcji kwasem szczawiowym. Wykazano także transkrypty przypisane do dehydrogenazy celobiozowej (CDH) oraz  $\beta$ -glukuronidazy, jednak nie wykazano różnic w ich ekspresji pod wpływem dodatku kwasu szczawiowego.

Spośród transkryptów dla genów zaangażowanych w metabolizm kwasu szczawiowego, wykazano obecność jednego transkryptu adnotowanego jako dekarboksylaza kwasu szczawiowego i dziewięciu transkryptów dla dehydrogenazy kwasu mrówkowego. Dehydrogenaza kwasu mrówkowego zaliczana jest do enzymów katabolizmu kwasu szczawiowego, który katalizuje rozkład kwas mrówkowy do dwutlenku węgla z jednoczesną redukcją cząsteczki  $\text{NAD}^+$ . Trzy spośród dziewięciu stwierdzonych transkryptów dla dehydrogenazy kwasu mrówkowego, wykazywały zwiększony poziom ekspresji w hodowlach *A. biennis* indukowanych kwasem szczawiowym. Należy podkreślić, że stopień indukcji jednego z transkryptów genu dla dehydrogenazy kwasu mrówkowego był najwyższy spośród wszystkich stwierdzonych transkryptów w przeprowadzonym doświadczeniu. Spośród enzymów bezpośrednio zaangażowanych w rozkład kwasu szczawiowego w analizowanym transkrypcyjnie wykazano ekspresję tylko jednego genu. W hodowlach indukowanych kwasem szczawiowym ekspresja genu dla dekarboksylazy kwasu szczawiowego ulegała znaczącemu zwiększeniu. Ta obserwacja wymaga dalszego wyjaśnienia ze względu na brak stwierdzanej aktywności dekarboksylazy kwasu szczawiowego w hodowlach *A. biennis*. Najlepiej opisane grzybowe oksydazy kwasu szczawiowego, izolowane z grzybni *Ceriporiopsis subvermispora*, kodowane są przez dwa geny. Poza tym oksydaza izolowana z *C. subvermispora* wykazuje poboczną aktywność dekarboksylazy kwasu szczawiowego (Escutia i wsp., 2005). Struktura tego enzymu bardziej przypomina grzybowe dekarboksylazy kwasu szczawiowego niż poznane do tej pory oksydazy kwasu szczawiowego izolowane z roślin. Oksydaza kwasu szczawiowego z *C. subvermispora* podobnie jak poznane do tej pory grzybowe dekarboksylazy kwasu szczawiowego, zaliczona została do białek z rodziny bikupin, odmiennie niż roślinne oksydazy kwasu szczawiowego zaliczane do monokupin.

Z dostępnych danych w literaturze wynika, że biosynteza kwasu szczawiowego związana jest z cyklem kwasów trójkarboksylowych oraz cyklem glioksalowym z istotną rolą liazy izocytrynianowej (EC 4.1.3.1). Enzymami bezpośrednio zaangażowanymi w przekształcenie szczawiooctanu lub glioksalanu w kwas szczawiowy, są odpowiednio grzybowa hydrolaza szczawiooctanowa (EC 3.7.1.1) oraz dehydrogenaza glioksalowa (EC 1.2.1.17) (Munir i wsp., 2001; Ohno i wsp., 2015). W trakcie analizy transkryptomu *A. biennis* wykazano obecność transkryptów dla wszystkich genów zaangażowanych we wspomniane szlaki. Nie wykazano jednak różnic w ekspresji tych genów pod wpływem kwasu szczawiowego. Nie znaleziono transkryptów genów dla hydrolazy szczawiooctanowej

oraz oksydazy gliksalanowej czyli dwóch enzymów bezpośrednio odpowiedzialnych za syntezę kwasu szczawiowego. Należy podkreślić, że przeprowadzone doświadczenia stanowią pierwszą analizę całego transkryptomu grzyba *Abortiporus biennis*. Na uwagę zasługuje także fakt, że jedynie około 50% spośród badanych transkryptów dla genów *A. biennis* znalazło adnotacje w bazach genetycznych. Znalezienie funkcji dla pozostałych nieopisanych transkryptów stanowi wyzwanie na przyszłość.

***Najważniejszym efektem przeprowadzonych na tym etapie doświadczeń opisanych w pracy [O6] była pierwsza opublikowana analiza całego transkryptomu A. biennis oraz wykazanie wpływu kwasu szczawiowego na ekspresję genów zaangażowanych w proces rozkładu kompleksu ligninocelulozy.***

#### LITERATURA:

1. Arantes V., Milagres A.M.F. The synergistic action of ligninolytic enzymes (MnP and Laccase) and Fe<sup>3+</sup>-reducing activity from white-rot fungi for degradation of Azure B. *Enz. Microb. Technol.* (2007) 42, 17-22.
2. Baldrian P. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enz. Microb. Technol.* (2003) 32, 78-91.
3. Baldrian P., Valaskova V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* (2008) 32, 501-521.
4. Bugg T.D., Ahmad M., Hardiman E.M., Rahmanpour R. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Nat. Prod. Rep.* (2011) 28, 1883–1896.
5. Cragg S.M., Beckham G.T., Bruce N.C., Bugg T.D.H., Distel D.L., Dupree P., Etxabe A.G., Goodell B.S., Jellison J., McGeehan J.E., McQueen-Mason S.J., Schnorr K., Walton P.H., Watts J.E.M., Zimmer M. Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. *Curr. Opin. Chem. Biol.* (2015) 29, 108-119.
6. Dutton M.V., Evans C.S. Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Can. J. Microbiol.* (1996) 42, 881-895.
7. Escuita M.R., Bowate L., Edwards A., Bottrill A.R., Burell M.R., Polanco R., Vicuna R., Bornemann S. Cloning and sequence of two *Ceriporiopsis subvermispora* bicupin oxalate oxidase allelic isoforms: implication for the reaction specificity of oxalate oxidases and decarboxylases. *Appl. Environ. Microbiol.* (2005) 71, 3608-3616.
8. Gadd G.M., Bahri-Esfahani J., Li Q., Rhee Y.J., Wei Z., Fomina M., Liang X. Oxalate production by fungi: significance in geomycology, biodeterioration and biodegradation. *Fungal Biol. Rev.* (2014) 28, 36-55.
9. Gadd G.M. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol. Res.* (2007) 111, 3-49.

10. Gibson M.I., Chen P.Y-T., Johnson A.C., Pierce E., Can M., Ragsdale S.W., Drennan C.L. One-carbon chemistry of oxalate oxidoreductase captured by X-ray crystallography. *PNAS* (2016) 113, 320-325.
11. Hofrichter M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enz. Microb. Technol.* (2002) 30, 454-466.
12. Janusz G, Pawlik A., Sulej J, Swiderska-Burek U., Jarosz-Wilkolazka A. Paszczynski A. Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* doi: 10.1093/femsre/fux049.
13. Leonowicz A., Matuszewska A., Luterek J., Ziegenhagen D., Wojtaś-Wasilewska M., Cho N-S., Hofrichter M., Rogalski J. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genet. Biol.* (1999) 27, 175–185.
14. Lundell T.K., Makela M.R., Hilden K. Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes – ecological, functional and phylogenetic review. *J. Basic Microbiol.* (2010) 50, 5-20.
15. Makela M.R., Galkin S., Hatakka A., Lundell T. Production of organic acids and oxalate decarboxylase in lignin-degrading white rot fungi. *Enz. Microb. Technol.* (2002) 30, 542-549.
16. Munir E., Yoon J.J., Tokimatsu T., Hattori T., Shimada M. A physiological role for oxalic acid biosynthesis in the wood rotting basidiomycete *Fomitopsis palustris*. *PNAS* (2001) 98, 11126-11130.
17. Nousiainen P., Kontro J., Manner H., Hatakka A., Sipilä J. Phenolic mediators enhance the manganese peroxidase catalyzed oxidation of recalcitrant lignin model compounds and synthetic lignin. *Fungal Genet. Biol.* (2014) 72, 137-149
18. Ohno K.M., Clausen C.A., Green III F., Diehl S.V. Insights into the mechanism of copper-tolerance in *Fibroporia radiculosa*: The biosynthesis of oxalate. *Int. Biodeter. Biodegr.* (2015) 105, 90-96.
19. Svedružić D., Jónsson S., Toyota C. G., Reinhardt L. A, Ricagno S., Lindqvist Y., Richards N. G. J: The enzymes of oxalate metabolism: unexpected structures and mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* (2005) 433,176-192.
20. Vaisei E.B., Cheldelin V.H., Newburgh R.W. Oxalate oxidation by an obligately parasitic fungus *Tilletia contraversa*. *Arch. Biochem. Biophys.* (1961) 95, 66-69.

**PODSUMOWANIE WYNIKÓW BADAŃ STANOWIĄCYCH TREŚĆ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO PRZEDSTAWIONEGO W POSTĘPOWANIU HABILITACYJNYM ORAZ OMÓWIENIE EWENTUALNEGO ICH WYKORZYSTANIA:**

Najważniejsze osiągnięcia badawcze zrealizowanego przeze mnie cyklu doświadczeń stanowiących treść osiągnięcia naukowego stanowi:

1. Przeanalizowanie 28 szczepów grzybów zaliczanych do białej zgnilizny drewna, w kierunku wytwarzania kwasów organicznych w obecności nierozpuszczalnych tlenków metali w podłożach. Wykazanie udziału kwasu szczawiowego w procesie rozpuszczania tlenków metali obecnych w podłożach wzrostu tych grzybów.
2. Wykazanie zdolności grzyba *Abortiporus biennis* do wzrostu w obecności tlenków metali:  $\text{Cu}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CuFe}_2\text{O}_4\text{Zn}$ ,  $\text{CdO}$ ,  $\text{MnO}_2$  i  $\text{PbO}$ . Stwierdzono, że najwyższą toksyczność wykazywały jony kadmu oraz w drugiej kolejności jony ołowiu i następnie cynku. W mniejszym stopniu wzrost grzybni hamowały tlenki  $\text{Cu}_2\text{O}$  i  $\text{MnO}_2$ . Obecność w podłożu tlenków  $\text{Al}_2\text{O}_3$  i  $\text{CuFe}_2\text{O}_4\text{Zn}$  nie hamowała wzrostu *A. biennis*.
3. Stwierdzenie podwyższonego stężenia kwasu szczawiowego w podłożach wzbogaconych tlenkami metali z wyjątkiem podłoża wzbogaconego  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{PbO}$  i  $\text{CdO}$ .
4. Wykazanie negatywnego wpływu metali ciężkich, obecnych w podłożu w postaci tlenków ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CuFe}_2\text{O}_4\text{Zn}$ ,  $\text{CdO}$ ,  $\text{MnO}_2$ ), na morfologię grzybni *A. biennis*. Grzybnia pod wpływem metali ciężkich wykazywała zwiększające się rozgałęzienie strzępek oraz nieregularne występowanie sept wewnątrz strzępek i wyraźnie zwiększoną liczbę spor.
5. Ocena stopnia preferencji w bioakumulacji metali ciężkich we wnętrzu grzybni *A. biennis*. Wykazano zmieniający się wraz ze zmianą stężenia metalu w podłożu stopień bioakumulacji metali.
6. Przedstawienie zmian ultrastruktury komórek grzybni *Abortiporus biennis* wywołanych obecnością jonów kadmu i ołowiu w środowisku wzrostu grzybni oraz wykazanie lokalizacji tych jonów na poziomie komórkowym.

7. Wykrycie i opisanie po raz pierwszy w literaturze naukowej aktywności oksydazy kwasu szczawiowego (EC 1.2.3.4) u *Abortiporus biennis* i przedstawienie podstawowej charakterystyki enzymu.
8. Przedstawienie pierwszej analizy transkryptomu *Abortiporus biennis* oraz wpływu kwasu szczawiowego na metabolizm tego grzyba. Wykazanie zmian na poziomie transkrypcji dotyczących syntezy enzymów zaangażowanych w rozkład kompleksu ligninocelulozy zachodzących pod wpływem dodatku kwasu szczawiowego.

Wyniki zaprezentowane w treści osiągnięcia naukowego przedstawionego w postępowaniu habilitacyjnym mogą znaleźć zastosowanie w opracowywaniu sposobów bioremediacji metali ciężkich przez grzyby. Nowy enzym - oksydaza kwasu szczawiowego wykazany w *Abortiporus biennis*, może być wykorzystany w projektowaniu testów diagnostycznych służących do wykrywania szczawianów w moczu. Wykazany na poziomie transkrypcji wpływ kwasu szczawiowego na metabolizm *A. biennis* może potencjalnie pomóc w lepszym zrozumieniu regulacji procesu rozkładu ligninocelulozy i co za tym idzie opracowywaniu metod stymulacji lub hamowania tego procesu.

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane **w 6 oryginalnych pracach naukowych**. We wszystkich byłem głównym wykonawcą eksperymentów, wniosłem też znaczący wkład w koncepcję badań, analizę i opracowanie graficzne wyników oraz przygotowanie manuskryptów. **We wszystkich pracach byłem autorem korespondencyjnym.**

#### 4. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

##### A). STUDIA I PRACA MAGISTERSKA

Jestem absolwentem Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS (obecnie Wydział Biologii i Biotechnologii UMCS). Studia ukończyłem z wynikiem bardzo dobrym. Tytuł magistra biotechnologii uzyskałem w 2001 roku na podstawie obronionej pracy magisterskiej pt. „*Optymalizacja warunków wytwarzania inwertazy i inulinazy przez *Aspergillus niger* 13/36 w warunkach hodowli wglębnej*”, wykonanej w Zakładzie Mikrobiologii Przemysłowej na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UMCS w Lublinie pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Fiedurka. W pracy magisterskiej zoptymalizowałem warunki dla wytwarzania inulinazy

i inwertazy przez *Aspergillus niger*. Oprócz optymalnego składu podłoża, wykazano w procesie biosyntezy inulinazy możliwość zastosowania niekonwencjonalnego napowietrzania podłoża poprzez rozkład nadtlenu wodoru przez rosnącą grzybnię. Wykazano również korzystny wpływ dodatku martwej biomasy grzybni do podłoża na stwierdzane aktywności inwertazy i inulinazy.

#### **B). PRACA NAUKOWO-BADAWCZA PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA**

Po ukończeniu studiów magisterskich od października 2001 roku rozpocząłem 4-letnie **Studia Doktoranckie z zakresu biologii prowadzone na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi**. Badania w ramach Studiów Doktoranckich prowadziłem w Zakładzie Biochemii UMCS pod kierunkiem Prof. dr hab. Elżbiety Dernałowicz-Malarczyk. Badania dotyczyły określenia jakościowej i ilościowej dynamiki wydzielania kwasów karboksylowych do podłoży hodowlanych wybranych grzybów degradujących drewno. W celu realizacji zaplanowanych badań opracowałem warunki rozdziału kwasów organicznych z użyciem technik wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej. Badania miały określić związek pomiędzy ilością dostępnego w podłożu wzrostowym azotu i glukozy, a wydzielaniem do podłoża wzrostowego kwasu szczawowego bądź innych kwasów karboksylowych oraz aktywnością enzymów lignolitycznych, takich jak peroksydaza manganozależna (MnP) i lakaza. Spośród wytypowanych do badań 8 szczepów grzybowych kwas szczawowy jako jedyny wydzielany do podłoża kwas organiczny wykryto w podłożach pięciu z nich: *Trametes versicolor*, *Bjerkandera fumosa*, *Fomitopsis pinicola*, *Fomes fomentarius*, *Innonotus obliquus*. Zaobserwowano brak lub wyraźne zahamowanie wydzielania kwasu szczawowego w warunkach limitowania dostępności azotu. Z wyjątkiem *Innonotus obliquus* wyższe stężenia kwasu szczawowego wykazano w podłożach z niższą zawartością glukozy w podłożu. Aktywność lakazy wykazano w podłożach *F. fomentarius*, *T. versicolor*, *F. pinicola*, natomiast aktywność MnP pojawiała się we wszystkich badanych szczepach ale różniła się u poszczególnych szczepów w zależności od składu podłoża.

Dane literaturowe wskazują, że zarówno jony manganu jak i żelaza mogą pełnić ważną rolę w procesach zaangażowanych w degradację kompleksu ligninocelulozy i to zarówno we wczesnych etapach procesu jak i w procesie enzymatycznym. W ramach prowadzonych w trakcie studiów doktoranckich badań, interesował mnie również wpływ jonów manganu na aktywność ligninolityczną grzybów oraz związane z tym wydzielanie kwasu szczawowego do podłoża. Ten etap badań prowadziłem na dwóch grzybach:

*Bjerkandera fumosa* oraz *Stropharia rugoso-annulata*, u których zaobserwowano wzrost aktywności MnP w podłożach z dodatkiem jonów manganu. W hodowlach *B. fumosa* zaobserwowano mniejszą kumulację kwasu szczawiowego w podłożach z dodatkiem manganu i zauważono związek pomiędzy wyższą aktywnością MnP, a niższym stężeniem kwasu szczawiowego w badanych podłożach. W hodowlach *S. rugoso-annulata* nie wykryto kwasu szczawiowego, ani w podłożach z dodatkiem manganu ani w podłożach kontrolnych.

Następny etap badań związany był z oceną zdolności do chelatowania jonów żelaza przez *B. fumosa* oraz udziału w tym procesie kwasu szczawiowego. Prowadzone doświadczenia wykazały wysoką efektywność grzyba *B. fumosa* w syntezie związków chelatujących jony żelaza. Dokładniejsze analizy ujawniły, że *B. fumosa* wydziela siderofory o charakterze hydroksamowym. Zawartość kwasu szczawiowego była znacznie wyższa w hodowlach *B. fumosa*, w których stwierdzano zdolność do chelatowania jonów żelaza.

*Badania wykonane w ramach mojej pracy doktorskiej zostały częściowo sfinansowane ze środków Unii Europejskiej z Europejskiego Funduszu Społecznego, w ramach Zintegrowanego Programu Operacyjnego Rozwoju Regionalnego (Program Stypendium Unijnego dla Studentów Studium Doktoranckiego UMCS).* Wyniki przeprowadzonych doświadczeń stały się treścią przygotowanej rozprawy doktorskiej zatytułowanej: „Związki pomiędzy syntezą kwasu szczawiowego a aktywnością enzymatyczną grzybów rozkładających drewno”, którą obroniłem 16 listopada 2005 roku uzyskując stopień doktora nauk biologicznych. Promotorem pracy doktorskiej była Prof. dr hab. Elżbieta Dernałowicz-Malarczyk, a recenzentami Prof. dr hab. Jerzy Długoński z Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Łódzkiego oraz Dr hab. Marian Tomasiak z Zakładu Chemii Fizycznej, Wydziału Farmacji Akademii Medycznej w Białymstoku.

Wyniki doświadczeń prowadzonych przeze mnie przed obroną doktoratu stały się częścią następujących opracowań naukowych:

Nr	Publikacja, dane bibliograficzne	IF	Punkty MNiSW
[1]	Malarczyk E., Paździoch-Czochra M., Kandfer-Szerszeń M., Szuster-Ciesielska A., Choma A., Jarosz-Wilkolazka A., <b>Graż M.</b> , Leonowicz A. (2002) Low molecular antioxidants in <i>Basidiomycota</i> cultures. <i>Proc. XI Biennial Meeting of International Society for Free Radical Research International</i> , July 16-20, Paris, France, Monduzzi Editore, 616–621.	0	3



[2]	<b>Graż M.</b> , Jarosz-Wilkołazka A., Malarczyk E., Cho N.S., Leonowicz A. (2003) Studies on the production of organic acids by wood-rotting fungi in rich and limited media. <i>Proc. 4<sup>th</sup> Intern. Symposium on New Horizon of Bioscience in Forest Products Field.</i> , April 24-25, Cheongju, Korea, 263-270.	0	3
[3]	Leonowicz A., Janusz G., Jarosz-Wilkołazka A., Gadagi R., <b>Graż M.</b> , Zawadzki P., Ginalska G., Cho N.S. (2003) Acetovanillone and acetosyringone intensify degradation of a nonphenolic $\beta$ -O-4 lignin model dimer by <i>Cerrena unicolor</i> laccase. <i>Proc. 4<sup>th</sup> Intern. Symposium on New Horizon of Bioscience in Forest Products Field.</i> , April 24-25, Cheongju, Korea, 154-165.	0	3
[4]	Jarosz-Wilkołazka A., <b>Graż M.</b> (2004) Organic acids production by basidiomycetes in the presence of oxides. <i>Proc. Intern. Conf. on Bioremediation of Soil and Grounwater</i> , September 5-8, Cracow, Poland, 193-205.	0	3

Część wyników zawartych w pracy doktorskiej została opublikowana już po uzyskaniu stopnia doktora w pracy [D7].

Nr	Publikacja, dane bibliograficzne	IF	Punkty MNiSW
[D7]	<b>Graż M.</b> , Jarosz-Wilkołazka A. (2011) Oxalic acid, versatile peroxidase secretion and chelating ability of <i>Bjerkandera fumosa</i> in rich and limited culture conditions. <i>World J. Microbiol. Biotechnol.</i> 27: 1885–1891.	1,532	20

Wyniki badań w których uczestniczyłam przed uzyskaniem stopnia doktora stały się również treścią streszczeń zaprezentowanych na konferencjach międzynarodowych (7) oraz krajowych (2).

#### C). PRZEBIEG MOJEJ PRACY NAUKOWEJ PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA ORAZ REALIZOWANE AKTUALNIE ZADANIA BADAWCZE

Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje:

- 21 prac eksperymentalnych w tym 17 w czasopismach z listy JCR
- 1 rozdział w monografii
- 23 doniesień zjazdowych, w tym 12 na konferencjach międzynarodowych

Wyniki wszystkich prac, poza publikacjami wchodzącymi w skład osiągnięcia naukowego, w których brałam udział po obronie doktoratu, zostały opublikowane w następujących artykułach naukowych:

Nr	Publikacja, dane bibliograficzne	IF [IF <sub>2016</sub> ]	Punkty MNiSW [MNiSW <sub>2016</sub> ]
[D1]	Jarosz-Wilkołazka A., Graż M., Braha B., Menge S., Schlosser D., Krauss G. J. (2006) Species-specific Cd-stress response in the white rot basidiomycetes <i>Abortiporus biennis</i> and <i>Cerrena unicolor</i> . <i>BioMetals</i> 19, 39-49.	<b>1,893</b> [2,183]	<b>15</b> [30]
[D2]	Jaszek M., Żuchowski J., Dajczak K., Cimek M., Graż M., Grzywnowicz K. (2006) Lignolytic enzymes can act as a part of multiple response system to oxidative stress in white rot <i>Basidiomycetes Fomes fomentarius</i> and <i>Tyromyces pubescens</i> . <i>Int. Biodeter. Biodegr.</i> 58, 168-175.	<b>1,619</b> [2,962]	<b>20</b> [30]
[D3]	Betlej I., Graż M. (2006) The identification of organic acids in <i>Trametes versicolor</i> culture, growing on a medium with CuHDO complex. <i>Folia Forest. Polon. B</i> , 37, 3-7.	<b>0</b>	<b>3</b> [3]
[D4]	Dec M, Wernicki A, Puchalski A, Urban-Chmiel R, Graż M. (2012) Purification and electrophoretic characterization of bovine conglutinin. <i>Biomed. Chromatogr.</i> 26, 684-690.	<b>1,945</b> [1,613]	<b>20</b> [20]
[D5]	Cyranka M, Graż M, Kaczor J, Kandefor-Szerszeń M, Walczak K, Kapka-Skrzypczak L, Rzeski W. (2011) Investigation of antiproliferative effect of ether and ethanol extracts of birch polypore medicinal mushroom, <i>Piptoporus betulinus</i> (Bull.:Fr.) P. Karst. (higher basidiomycetes) in vitro grown mycelium. <i>Int. J. Med. Mushr.</i> 13, 525-533.	<b>0,895</b> [1,272]	<b>15</b> [20]
[D6]	Malarczyk E, Paździoch-Czochra M, Graż M, Kochmańska-Rdest J, Jarosz-Wilkołazka A. (2011) Nonlinear changes in the activity of the oxygen-dependent demethylase system in <i>Rhodococcus erythropolis</i> cells in the presence of low and very low doses of formaldehyde <i>Nonlinear Biomed. Phys.</i> 5:9.	<b>0</b>	<b>8</b> [7]
[D7]	Graż M., Jarosz-Wilkołazka A. (2011) Oxalic acid, versatile peroxidase secretion and chelating ability of <i>Bjerkandera fumosa</i> in rich and limited culture conditions. <i>World J. Microbiol. Biotechnol.</i> 27, 1885-1891.	<b>1,532</b> [1,658]	<b>20</b> [20]
[D8]	Matuszewski L, Matuszewska A, Polkowska I, Jaszek M, Graż M, Mazurkiewicz T, Gągała J. (2013) Determination of pamidronate in bisphosphonate-enriched cement implanted in rats by ion-pair HPLC and capillary electrophoresis. <i>Bull Vet Inst Pulawy</i> , 57, 257-262.	<b>0,365</b> [0,462]	<b>20</b> [15]
[D9]	Jaszek M., Kos K., Matuszewska A., Graż M., Stefaniuk D., Osińska-Jaroszuk M., Prendecka M., Józwik E., Grzywnowicz K. (2014) Effective stimulation of the biotechnological potential of the medicinal white rot fungus: <i>Phellinus pini</i> by menadione-mediated oxidative stress. <i>Appl. Biochem. Biotechnol.</i> 174:644-656.	<b>1,735</b> [1,751]	<b>20</b> [25]
[D10]	Pozdnyakova N.N., Jarosz-Wilkołazka A., Polak J., Graż M., Turkovskaya O.V. (2015) Decolourisation of anthraquinone-and anthracene-type dyes by versatile peroxidases from <i>Bjerkandera fumosa</i> and <i>Pleurotus ostreatus</i> D1. <i>Biocatal. Biotrans.</i> 33, 69-80.	<b>0,892</b> [0,836]	<b>15</b> [15]
[D11]	Sójka-Ledakowicz J., Olczyk J., Polak J., Graż M., Jarosz-Wilkołazka A. (2015) Dyeing of textile fabrics with bio-dyes. <i>Fibres Text. East. Eur.</i> 23, 120-126.	<b>0,629</b> [0,626]	<b>25</b> [30]
[D12]	Prendecka M., Jaszek M, Graż M, Gluszak N., Malysz K., Nowak A., Żuchowski J, Malecka-Massalska T. (2016) Stimulation of the activity of a novel tannase produced in white-rot fungi <i>Phellinus pini</i> , <i>Fomes fomentarius</i> , and <i>Tyromyces pubescens</i> by medium supplementation. <i>Biotechnol. Appl. Biochem.</i> 63, 652-658.	<b>1,429</b> [1,413]	<b>20</b> [20]
[D13]	Polak J, Jarosz-Wilkołazka A., Szaląpata K., Graż M., Osinska-Jaroszuk M. (2016) Laccase-mediated synthesis of a phenoxazine compound with antioxidative and dyeing properties – the optimisation process. <i>New Biotechnol.</i> 33, 255-262.	<b>3,813</b> [3,813]	<b>30</b> [30]
[D14]	Wlizło K., Polak J., Graż M., Bryjak J., Jarosz-Wilkołazka A. (2015) Zastosowanie unieruchomionej lakazy grzybowej w biotransformacji związków aromatycznych. <i>Inż. Aparat. Chem.</i> 54, 4, 211-212.	<b>0</b>	<b>7</b> [7]

[D15]	Szałapata K., Osińska-Jaroszuk M., Graż M., Jarosz-Wilkołazka A. (2015) Analiza wydajności i specyficzności procesu immobilizacji syntetycznego inhibitora proteaz serynowych z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej. Inż. Aparat. Chem. 54, 3, 119-120.	0	7 [7]
[D16]	Graż M., Jarosz-Wilkołazka A., Rachwał K. (2017) Enzymatyczna synteza i rozkład kwasu szczawiowego. Enzymologia w obliczu wyzwań i możliwości XXI wieku. Wyd. Tygiel, Lublin. 7-26. (ISBN 978-83-65598-47-9)	0	2,5 [2,5]
<b>Suma punktów:</b>		<b>16,747</b> <b>[18,589]</b>	<b>247,5</b> <b>[281,5]</b>

Wyniki badań w których uczestniczyłam po uzyskaniu stopnia doktora stały się również treścią streszczeń zaprezentowanych na konferencjach międzynarodowych (12) oraz krajowych (11).

Moje zainteresowania badawcze z okresu pracy naukowej po uzyskaniu doktoratu można podzielić na kilka obszarów tematycznych:

1. Badania nad właściwościami bioaktywnymi wybranych ekstraktów grzybowych. Grupa grzybów białej zgnilizny drewna bogata jest w gatunki o znanych i opisanych w literaturze właściwościach leczniczych i bioaktywnych. Jednym z takich gatunków jest *Piptoporus betulinus*. W ramach tego tematu realizowałem projekt badawczy, finansowany z grantu Prorektora UMCS d/s Badań Naukowych i Współpracy Międzynarodowej pt.: „Ocena aktywności biologicznej ekstraktów z *Piptoporus betulinus* oraz zastosowanie podłoży pochodzących w procesach bioremediacji”, którego byłem kierownikiem. Wyniki doświadczeń zostały opisane w pracy [D5].
2. Badania dotyczące roli kwasu szczawiowego w procesach usuwania metali ze środowiska wzrostu grzybni. W ramach tego obszaru zainteresowań wytypowano grzyb *Abortiporus biennis*, który stał się obiektem doświadczeń, których wyniki weszły w skład prac przedstawionych w osiągnięciu naukowym zgłoszonym do postępowania habilitacyjnego [O1] [O2] [O3]. Wyniki zawarte są również w pracy [D1], która powstawała we współpracy międzynarodowej z Prof. Dietmar Schlosser, Department of Groundwater Microbiology, UFZ Centre for Environmental Research, Halle (Niemcy).
3. Wpływ kwasu szczawiowego na metabolizm *Abortiporus biennis* oraz charakterystyka i określenie roli oksydazy kwasu szczawiowego w *Abortiporus biennis* w czasie wzrostu w obecności metali ciężkich. Prace w tym temacie badawczym realizowane są

w ramach grantu finansowanego przez NCN „Charakterystyka i znaczenie nowej oksydazy kwasu szczawowego (OXOAb) w odpowiedzi *Abortiporus biennis* na obecność metali ciężkich w środowisku wzrostu” (2014/13/B/NZ9/02106), w którym jestem głównym wykonawcą. Opublikowane wyniki doświadczeń wykonanych w ramach tego projektu weszły jako część prac przedstawionych w osiągnięciu naukowym zgłoszonym do postępowania habilitacyjnego. [O4] [O5] [O6]

4. Wykazanie aktywności oksydazy kwasu szczawowego u *Abortiporus biennis* oraz fakt, że w literaturze znane są dwa gatunki grzybów posiadające zdolność do utleniania kwasu szczawowego - *Ceriporiopsis subvermispora* i *Tilletia contraversa*, skłoniły mnie do podjęcia próby sprawdzenia, czy oksydaza kwasu szczawowego jest enzymem szerzej rozpowszechnionym wśród grzybów rozkładających drewno. W ramach tego obszaru badawczego realizowany jest obecnie grant finansowany przez NCN „Nowa droga rozkładu kwasu szczawowego przez grzyby białej i brunatnej zgnilizny drewna” (2017/01/X/NZ9/00449), którego jestem kierownikiem.

Poza wymienionymi obszarami moich zainteresowań badawczych brałem udział w części doświadczalnej prac dotyczących:

- stymulacji procesów biodegradacyjnych u grzybów z wykorzystaniem indukowanego stresu oksydacyjnego. Wykazano stymulację takich enzymów jak lakaza i peroksydaza manganozależna w hodowlach *Fomes fomentarius*, *Tyromyces pubescens* i *Phellinus pini* pod wpływem dodatku menadionu i powiązane z tym zmiany w stężeniu kwasu szczawowego oraz dysmutazy ponadtlenkowej i formaldehydu. Wyniki opublikowano w pracach [D2] [D9],

- stymulacji wydzielania kwasów organicznych do podłoża *Trametes versicolor* pod wpływem obecnych w środowisku związków będących środkami ochrony drewna przed szkodliwym działaniem grzybów zawierających w składzie miedź. Wyniki opublikowano w pracy [D3],

- indukcji tannazy – enzymu hydrolizującego wiązania estrowe w kompleksie tanin. Kwas galusowy powstający w wyniku hydrolizy kwasu taninowego, może znaleźć zastosowanie w przemyśle spożywczym, kosmetycznym czy biomedycznym. Badania prowadzono wykorzystując grzyby *Phellinus pini*, *Fomes fomentarius* oraz *Tyromyces pubescens*. Wyniki opublikowano w pracy [D12],

- monitorowania procesu uwalniania pamidronianu z biomateriałów stosowanych jako cement kostny. Zaobserwowano uwalnianie pamidronianu z badanego biomateriału, co jest

korzystne ze względu na jego udział w procesach zmniejszających procesy resorpcji kości. Wyniki opublikowano w pracy [D8],

- określeniu we współpracy z dr Martą Dec z Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie masy cząsteczkowej wołowej konglutyniny, surowiczego białka, które bierze udział w mechanizmach obrony przed drobnoustrojami. Wyniki opublikowano w pracy [D4],

- badań nad wpływem małych stężeń formaldehydu na aktywność 4-O-demetylazy bakterii *Rhodococcus erythropolis*. Wyniki opublikowano w pracy [D6],

- unieruchamiania inhibitorów proteaz serynowych na matrycy ze szkła o kontrolowanej porowatości. Wyniki opublikowano w pracy [D15].

Brałem udział również w badaniach realizowanych w zespole badawczym dr hab. Anny Jarosz-Wilkolażkiej prof. UMCS, dotyczących syntezy barwników (biotransformacja) z użyciem lakazy (publikacje [D11], [D13], [D14]) oraz dekoloryzacji barwników z użyciem peroksydazy hybrydowej (publikacja [D10]). Prace związane z wykorzystaniem peroksydazy odbywały się *we współpracy międzynarodowej z Prof. Natalia Pozdnyakowa z Instytutu Biochemii i Fizjologii Roślin i Mikroorganizmów Rosyjskiej Akademii Nauk w Saratowie (Rosja)*.

W pracy [D16], przedstawiono zebrane informacje dotyczące enzymów, które są zaangażowane w biosyntezę oraz rozkład kwasu szczawiowego.

Obecnie oprócz realizacji projektu MINIATURA „*Nowa droga rozkładu kwasu szczawiowego przez grzyby białej i brunatnej zgnilizny drewna*”, którego jestem kierownikiem oraz projektu „*Charakterystyka i znaczenie nowej oksydazy kwasu szczawiowego (OXOAb) w odpowiedzi *Abortiporus biennis* na obecność metali ciężkich w środowisku wzrostu*”, którego jestem głównym wykonawcą, biorę udział w realizacji kolejnych trzech projektów finansowanych ze środków NCN, dotyczących:

- wykorzystania dehydrogenazy celobiozowej z *C. unicolor* – projekt kierowany przez dr Justynę Sulej pt.: „*Ocena potencjału antyoksydacyjnego i przeciwdrobnoustrojowego grzybowej dehydrogenazy celobiozowej jako składnika opakowań aktywnych*” (nr 2015/17/D/NZ9/02066),

- wpływu światła na metabolizm grzybowy - projekt kierowany przez dr Grzegorza Janusza pt.: „*Wpływ światła na metabolizm C. unicolor*” (nr 2014/15/B/NZ9/01990)

- biotechnologicznego zastosowania lakazy – projekt kierowany przez dr Jolantę Polak pt.: „*Enzymatyczna synteza związków o aktywności antymikrobiologicznej i antyoksydacyjnej w dwuskładnikowych układach transformacyjnych*” (nr umowy: 2016/21/D/NZ9/02460)

Sumaryczny współczynnik wpływu (**IF**) moich prac, opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych (bez uwzględnienia prac złożonych do oceny w postępowaniu habilitacyjnym) zgodnie z rokiem opublikowania wyniósł **16,747**. IF obowiązujący w roku 2016 wynosi **18,589**. Suma punktów MNiSW uzyskanych przeze mnie za prace opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora (bez uwzględnienia prac złożonych do oceny w postępowaniu habilitacyjnym) zgodnie z rokiem opublikowania wyniósł **247,5 pkt**. Natomiast dla zgodnie z obecnie aktualnym ujednoliconym wykazem czasopism punktowanych wynosi **281,5 pkt**.

## 5. PLANY NAUKOWE

Moje najbliższe plany na przyszłość obejmują kontynuację badań realizowanych dotyczących obecności oksydazy kwasu szczawowego w grzybach rozkładających drewno i jej potencjalnej roli w rozkładzie ligninocelulozy. Badania te będą rozszerzeniem działań związanych obecnie z realizacją projektu pt.: „*Nowa droga rozkładu kwasu szczawowego przez grzyby białej i brunatnej zgnilizny drewna*”.

Kolejne zagadnienie, które wymaga wyjaśnienia, związane jest z procesem syntezy kwasu szczawowego u grzybów. Ciekawą koncepcję wyjaśniającą akumulację szczawianu przez grzyby brunatnej zgnilizny drewna, na przykładzie metabolizmu *F. palustris*, przedstawił Munir i wsp. (2001). Według badaczy szczawian powstaje jako produkt procesu niecałkowitego utleniania glukozy obecnej w podłożu wzrostowym grzyba. Koncepcja ta, nie została jednak potwierdzona dla grzybów białej zgnilizny drewna i wymaga badań u tej grupy grzybów.

W obszarze moich zainteresowań są również próby potencjalnego wykorzystania grzybowej oksydazy kwasu szczawowego jako narzędzia biotechnologicznego np. w testach diagnostycznych służących oznaczaniu szczawianów.

## PODSUMOWANIE AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ

DANE BIBLIOMETRYCZNE	IF [IF <sub>2016</sub> ]	PUNKTY MNIŚW [MNIŚW <sub>2016</sub> ]
Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego = <b>6 publikacji</b>	<b>12,052</b> [12,265]	<b>115</b> [140]
Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie <i>Journal Citation Reports</i> (JCR) (z wyłączeniem prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego): A) przed uzyskaniem stopnia doktora: <b>brak</b> B) po uzyskaniu stopnia doktora = <b>11 publikacji</b>	<b>16,684</b> [18,589]	<b>247,5</b> [281,5]
Publikacje naukowe w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazach lub na liście JCR: A) przed uzyskaniem stopnia doktora = <b>4 publikacje</b> B) po uzyskaniu stopnia doktora = <b>5 publikacji</b>		<b>12</b>  <b>24,5</b> [24,5]
Liczba streszczeń naukowych prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych: A) przed uzyskaniem stopnia doktora = <b>9</b> B) po uzyskaniu stopnia doktora = <b>23</b>		
<b>ŁĄCZNA LICZBA PUBLIKACJI*</b>	<b>RAZEM - 26</b>	
	<b>Łączny IF</b> [IF <sub>2016</sub> ]	<b>28,736</b> [30,854]
	<b>Łączny MNIŚW</b> [MNIŚW <sub>2016</sub> ]	<b>399</b> [446]
<i>Wykaz wszystkich prac obejmujących mój dorobek naukowy przedstawiono w Załączniku 3</i>		
<b>OCENA BIBLIOMETRYCZNA (Z DNIA 7 GRUDNIA 2017)</b>		
Całkowita liczba cytowań (wg <i>Web of Science</i> ):	<b>117</b>	
Całkowita liczba cytowań bez autocytowań (wg <i>Web of Science</i> ):	<b>95</b>	
Całkowita liczba cytowań (wg <i>Scopus</i> ):	<b>135</b>	
Całkowita liczba cytowań bez autocytowań (wg <i>Scopus</i> ):	<b>111</b>	
Indeks <i>Hirscha</i> (wg <i>Web of Science</i> ):	<b>7</b>	
Indeks <i>Hirscha</i> (wg <i>Scopus</i> ):	<b>8</b>	
Indeks <i>Hirscha</i> bez autocytowań (wg <i>Scopus</i> ):	<b>7</b>	

