

Prof. dr hab. Katarzyna Turnau

Kraków 18.02.2017

Instytut Nauk o Środowisku

Uniwersytetu Jagiellońskiego

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Joanny Brzeszcz

pt. „Drobnoustroje środowiskowe, zdolne do jednoczesnego rozkładu węglowodorów alifatycznych i aromatycznych – perspektywy wykorzystania w praktyce bioremediacji gleb zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi”

Przedstawiona do recenzji rozprawa została przygotowana w języku polskim. Badania wykonano w ramach projektu grantowego PRELUDIUM, finansowanego przez NCN w ramach umowy UMO-2012/07/N/NZ9/00920. Praca jest bardzo obszerna, obejmuje 255 stron, 9 rozdziałów, 6 załączników, 44 ryciny, ponad 40 tabel i literaturę obejmującą blisko 400 pozycji. Praca stanowi logicznie zaplanowaną całość choć jej realizacja na skutek obszerności i nadmiernej (moim zdaniem) skrupulatności w zestawianiu wszelkich możliwych danych literaturowych nastęczyła rozlicznych problemów recenzentowi, zwłaszcza rozdział wstępu, który zdecydowanie można było skrócić, a informacje zebrać na przykład w formie schematów. Niektóre części „Wstępu” były niejasne zwłaszcza, że przy tak obszernej treści trudno było uniknąć rozlicznych błędów interpunkcji i nieco zbyt długich zdań. Zwykle materiał ze wstępu może stanowić, niemal bez zmian, rodzaj przeglądu do prawie bezpośredniego opublikowania. W tym jednak wypadku trzeba będzie jeszcze mocno nad tym popracować. Nie znaczy to, że rozdział wstępu nie jest cennym opracowaniem, zdecydowanie należy do najbardziej szczegółowych opracowań zagadnienia.

Zgodnie z rozdziałem trzecim (hipotezy badawcze i cel pracy) doktorantka obrała sobie za cel odszukanie i identyfikację bakterii wykazujących zdolność do równoczesnego rozkładu węglowodorów alifatycznych i aromatycznych. Cel ten realizowano na dwa sposoby: poprzez analizy klasyczne, poprzez izolację szczepów, identyfikację i poznanie szlaków metabolicznych oraz poprzez analizę metagenomową i poszukiwanie genów funkcjonalnych metabolizmu obu szlaków o wspólnej przynależności taksonomicznej. Zdecydowanie wspomniany rozdział 3. można było także skrócić i przedstawić w punktach, zwłaszcza że ryc. 9 właściwie wyczerpuje to zagadnienie.

Rozdział „Materiały i Metody” napisany jest precyzyjnie i ze szczegółami. Tu jednak szczegółowość zasługuje na pełną pochwałę. Rozdział obejmuje charakterystykę materiału (zebranego z siedmiu terenów określanych jako zanieczyszczone i czterech miejsc tzw. referencyjnych), metodykę sekwencjonowania i analizy danych metagenomowych, analizy mikrobiologiczne, przygotowanie prób do obserwacji przy użyciu elektronowego mikroskopu skaningowego, identyfikację szczepów o poszukiwanych własnościach, analizy filogenetyczne, analizę widm masowych MALDI-TOF białek rybosomalnych i ich ekstrakcji, charakterystykę cech biochemicznych za pomocą testów paskowych, sekwencjonowanie genomów bakteryjnych i biotransformację węglowodorów aromatycznych i alifatycznych oraz analizy statystyczne.

W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono występowanie bakterii wykazujących zdolność transformacji obu typów związków zarówno z terenów zanieczyszczonych jak i tzw. gleb czystych. Wobec tego Autorka zaprzecza założeniu, że te organizmy występują tylko w środowiskach zanieczyszczonych. Według mojej oceny nie ma tzw. „miejsc czystych”, chociażby zwykła sadza może być źródłem zanieczyszczenia i w związku z tym nie da się na postawione pytanie odpowiedzieć.

Bardzo interesującym wynikiem badań jest stwierdzenie przynależności większości poszukiwanych szczepów do typu Actinobacteria i powszechnego występowania cechy u rodzaju *Mycobacterium*. Aktywność kataboliczna węglowodorów aromatycznych i alifatycznych potwierdzono u rodzaju *Pseudomonas* (Gammaproteobacteria). Ta zdolność jest szczególnie istotna ze względu na powszechne występowanie tego rodzaju w interakcji z roślinami i grzybami mykoryzowymi. Warto przeprowadzić badania sprawdzające efekt połączenia tych trzech grup w ramach fitoremediacji. Autorka wspomina o możliwości

poprawy aktywności bakterii poprzez korekcję stosunku C:N:P. W pełni zgadzam się z tym stwierdzeniem, jednak warto przebadać jakie barwniki będą się tworzyć u badanych organizmów w poszczególnych sytuacjach. Część wymienionych rodzajów tworzy barwniki karotenowe, a te biorą udział w ochronie mikroorganizmów przed wszelkiego typu warunkami ekstremalnymi/stresowymi. Może warto włączyć do takich badań analizy Ramanowskie, szczególnie w przypadku szczepów łatwo hodowalnych. Niekoniecznie obecność barwników jest związana z procesami katabolicznymi ale oporność zapewne tak. Zazwyczaj cenne są analizy mikroskopii skaningowej przy wizualizacji wzrostu bakterii na powierzchni kryształów wybranych związków. O ile wiem, to te badania były prowadzone tylko przy niewielkim udziale Doktorantki. Może w przyszłości warto zwrócić uwagę na metody, które można wykorzystać w Polsce, np. analizy EDAX mogłyby rzucić dodatkowe światło na możliwe suplementacje pierwiastków.

W pracy wykazano modyfikacje struktury zespołów mikroorganizmów na terenach zanieczyszczonych. To zjawisko jest całkowicie zrozumiałe i należy pamiętać, że populacje bakterii na ogół utrzymują potrzebne geny związane z metaloopornością, antybiotykoopornością lub katabolizmem innych zanieczyszczeń i w sytuacji kryzysowej upowszechniają te geny. Na ogół nie utrzymują tych genów we wszystkich osobnikach populacji bo ich utrzymanie jest energochłonne. W tym wypadku to transfer genów byłby odpowiedzialny za zmiany.

Analizy metagenomowe wykazały także obecność Archea w badanych próbach gleby. Ta informacja jest istotna i warta podkreślenia ponieważ są to na ogół organizmy nie poddające się hodowli i z tego względu przez długi czas były uważane za występujące w siedliskach ekstremalnych. Obecnie wiadomo, że stanowią one także powszechny składnik zbiorowisk bakteryjnych gleb, a w szczególności znaczą one tzw. drogową mapę grzybni ektomykoryzowej. To znów informacja, która może być przydatna w fitoremediacji. Przypuszczam, że warto byłoby sprawdzić potencjał bakterii związanych z mykoryzosferą roślin zasiedlających tereny zanieczyszczone ropą.

Doktorantka opisuje cały szereg bakterii u których uprzednio nie były znane właściwości związane z transformacją związków poliaromatycznych i alifatycznych. W dyskusji czytamy o wielu takich szczepach a na uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka znakomicie zdaje sobie sprawę ze swoich odkryć udowadniając znakomicie opanowaną

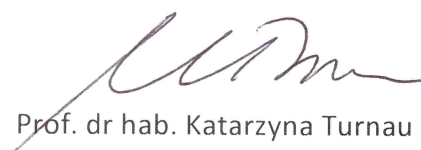
znajomość literatury. W porównaniu ze wstępem Dyskusja napisana jest o wiele bardziej przystępnie i pokazuje zarówno wiedzę jak i znaczne zaangażowanie Autorki w prowadzenie badań. Przeprowadzone badania metagenomowe uchylają rąbka tajemnicy „czarnej skrzynki” ale tak naprawdę nadal najistotniejsze praktyczne wnioski uzyskano w wyniku laboratoryjnej izolacji szczepów bakterii o zdolności katabolicznej wybranych związków. W kwestii rozwoju naszej wiedzy o mikrobiomie siedlisk glebowych pozostało jeszcze wiele do zrobienia np. rozpoznanie metatranskryptomu badanych gleb. Niewątpliwie będzie to jeszcze długi czas zajmowało Autorkę i osobiście mam nadzieję że Opiekunowie Doktorantki staną na wysokości zadania aby Doktorantkę zatrzymać i umożliwić jej dalszy rozwój.

W rozprawie znaleziono szereg niedociągnięć takich jak: niewłaściwa pisownia jednostek, niedociągnięcia w podpisach do rycin (brak opisu ryciny lub tabeli na stronie odpowiedniej tabeli lub ryciny, nie zawsze zachowana kolejność rycin, np. ryc. 44 i 43, użycie słowa koncentracja zamiast stężenia, brak spacji pomiędzy wartością temperatury a jednostką (°C) itp. Powyższe niedociągnięcia nie mają jednak istotnego znaczenia w ogólnej ocenie pracy.

Założone przez Doktorantkę cele zostały w pełni osiągnięte. Praca doktorska spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Mgr Brzeszcz wykazała się bardzo dobrą znajomością literatury, umiejętnością planowania i prowadzenia badań naukowych, znajomością metod biologii molekularnej i metod statystycznych, krytycyzmem w interpretacji wyników i wnioskowaniu. Ponieważ praca zawiera niezwykłą ilość nowych informacji, które w znacznym stopniu poszerzają naszą wiedzę uważam, że praca zasługuje na wyróżnienie.

W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie mgr Joanny Brzeszcz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, dn. 18. 02. 2017



Prof. dr hab. Katarzyna Turnau