

Toruń, 26.07.2024

Prof. dr hab. Maciej Walczak
Katedra Mikrobiologii
Środowiskowej i Biotechnologii
Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynarii UMK

Rada Naukowa Dyscypliny
Biotechnologia
Politechnika Warszawska

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Poli Łomży-Kalinowskiej pt. „Mikrobiologiczna dehalogenacja – charakterystyka i zastosowanie bakterii metabolizujących halogenowane związki organiczne”

Przedstawiona do recenzji praca została napisana w języku polskim oraz zaopatrzona w streszczenie w języku polskim i angielskim.

Cała praca liczy 137 stron, 20 tabel, 12 wykresów oraz 7 rycin. Autorka cytuje 247 pozycji literatury naukowej i różnych materiałów źródłowych a znaczna część cytowanej literatury pochodzi z ostatniej dekady.

Tytuł pracy dobrze i precyzyjnie odzwierciedla jej treść. Cała praca ma właściwy i typowy układ dla rozpraw naukowych. Podzielona jest na klasyczne rozdziały jak: streszczenie, wstęp, cel pracy, hipotezy badawcze, materiały i metody, wyniki wraz z dyskusją, podsumowanie, wnioski, literatura.

Ocena merytoryczna rozprawy

Wstęp pracy stanowi wprowadzenie w problematykę badawczą. Autorka stopniowo i systematycznie przedstawia poszczególne elementy składowe poruszanej problematyki, które złożą się później na główny problem badawczy. Przegląd wiedzy rozpoczyna się od ogólnych informacji na temat substancji, których losy w środowisku będzie badała Doktorantka. W dalszej części tego rozdziału Autorka skupia się na pestycydach należących do halogenowanych związków organicznych, ich budowie, skali produkcji, zastosowaniu, wpływie na środowisko naturalne. Kolejny etap to opis przemian HZO, w tym przemian mikrobiologicznych zachodzących w różnych warunkach środowiskowych wraz z przedstawieniem pochodnych tych związków i ich znaczenia. Z uwagi na złożoność tego zagadnienia przedstawione tu zostały najważniejsze informacje. Na podkreślenie zasługuje

jednak fakt, że Autorka nie unikała opisów skomplikowanych szlaków biochemicznych i przemian metabolicznych jakie mają miejsce podczas rozkładu HZO. Następnie Autorka zmierza w kierunku opisu różnych procesów prowadzących do usunięcia tych związków ze środowiska, zarówno procesów naturalnych i spontanicznych jak i stymulowanych i nadzorowanych przez człowieka.

Na początku części badawczej Autorka stawia bardzo jasny i precyzyjnie przedstawiony cel badań oraz cele szczegółowe, które mają pomóc w zweryfikowaniu postawionych hipotez.

W tym miejscu muszę podkreślić, że postawione hipotezy **nie sprawiają wrażenia dorobionych post factum**, co nie zdarza się często.

W dalszej części pracy (Materiały i metody) Autorka wykonała podział całej pracy na poszczególne etapy. Zabieg ten porządkuje i obrazuje pewną płynność i logikę jaka została zastosowana w zaplanowaniu i wykonaniu całości analiz chemicznych, mikrobiologicznych i molekularnych.

Schemat przedstawiony na stronie 37 doskonale oddaje zakres, stopień skomplikowania i ogrom prac jakich podjęła się Doktorantka. Warto tu podkreślić, że w większości są to badania na bardzo zaawansowanym poziomie. Świadczy to o dużej ambicji oraz wielkiej „rządzy badawczej”. Ilość, wielorakość i zaawansowany poziom badań wymusiły na Autorce współpracę z innymi jednostkami i osobami, co oczywiście należy ocenić bardzo pozytywnie. Tym niemniej ogrom zaplanowanych prac badawczych i ich zaawansowanie metodyczne moim zdaniem przerastają możliwości analityczne pojedynczej osoby, zwłaszcza osoby młodej, która dopiero uczy się warsztatu naukowego. Na ogół tak ambitne podejście do problemu badawczego stwarza w dalszej części poważne problemy w analizie ogromnej ilości wyników i ich poprawnej interpretacji, do czego wrócę w dalszej części recenzji.

Moje wątpliwości budzi także wybór miejsc z których pobierano próby gleby do badań. Jeżeli Autorka chciała badać miejsca, w których występuje skażenie pestycydami, w tym HZO (mam na myśli próbki 1-3), to wybór pól z przypadkowymi uprawami nie jest najlepszym pomysłem. Tym bardziej, że tego roku była na polach kukurydza, kapusta i pszenica, ale nie wiemy co było rok czy dwa wcześniej, a to mogło mieć wpływ na rodzaj i stężenia pestycydów w glebie. Uważam, że należało pobierać próby do badań o dużym i znanym skażeniu z tzw. pasów herbicydowych, które występują w sadach owocowych. W takim miejscach skażenie jest bardzo duże, stałe w czasie i można uzyskać informacje od plantatora jakie środki były stosowane w ostatnich latach.

Poza tym w opisach zastosowanych metod w niektórych miejscach użyto nie do końca właściwych określeń, np.: w punkcie 3.5.8. Autorka pisze „W celu **wykrycia** genu 16S rRNA...”. Moim zdaniem nie powinno być wykrycia, bo te geny tam są i jest to oczywiste, a raczej powinno się użyć sformułowania: W celu izolacji i amplifikacji genów 16S rRNA...

Mam też prośbę o wyjaśnienie czy punkt 3.5.12., to tzw. fingerprint?

Nie bardzo rozumiem czemu miały służyć prace wykonane w punkcie 3.5.18? Po co mieszano geny 16S rRNA różnych szczepów? Proszę więc o wyjaśnienie moich wątpliwości.

Nie wiem również czym kierowała się Doktorantka dobierając stężenia HZO w badania biotransformacji w laboratorium? Te stężenie są baaardzo wysokie i nie korespondują z tymi jakie są w środowisku, a przynajmniej tymi jakie zostały oznaczone w tej pracy.

W rozdziale wyniki Autorka precyzyjnie opisuje rezultaty badań chemicznych, mikrobiologicznych i molekularnych zwracając uwagę na najważniejsze z nich.

Wszystkie dane są w bardzo dobry sposób przedstawione i zobrazowane na wykresach czy rycinach. Sposób prezentacji graficznej nie budzi wątpliwości i nie ma charakteru „przerostu formy nad treścią”, co dziś jest dość nagminne. Opisy wyników są precyzyjne i dotyczą wszystkich danych jakie udało się zebrać, a tych jest ogrom. W tym miejscu wracam, do stwierdzenie, że jest to za dużo na młodego pracownika nauki. Widać to w braku możliwości, umiejętności syntetycznego łączenia wyników z różnych obszarów badań jakie wykonała.

Jednocześnie chciałby pochwalić Doktorantkę, bo pomimo pewnych braków w kojarzeniu wyników, to co zrobiła i jak opisała jest i tak imponujące.

Tym niemniej mam kilka pytań również do tej części pracy.

W opisie tabeli 4, Autorka pisze, że największe różnice odnotowano w przypadku stężeń baru (zakres: 33-132 mg/kg s.m.). Podczas gdy w przypadku stężeń miedzi zakres wynosi od 7 do 199 mg/kg s.m., a w przypadku cynku od 19 do 470 mg/kg s.m., a to chyba większe różnice.

Proszę również o próbę wyjaśnienia wyższych stężeń chloru w glebach zbliżonych do naturalnych w porównaniu do tych poddanych antropopresji.

Według uzyskanych wyników liczebność bakterii w glebach użytkowanych rolniczo oraz tych zbliżonych do naturalnych jest praktycznie taka sama. Nie widziałem tych gleb, ale nie jest to sytuacja normalna. Z drugiej strony tego typu sytuacje, są odnotowywane co raz częściej. Jednak proszę o ustosunkowanie się do tych, z natury rzeczy, nienormalnych wyników.

Bardzo ciekawe i zastanawiające wyniki Autorka przedstawiła w punkcie 4.2.3. Analiza metagenomowa wykazała tu większą częstość genów kodujących dehalogenazy metaboliczne i kometaboliczne w próbach gleb niezanieczyszczonych HZO. Jest to dziwne, logicznie

powinno być dokładnie odwrotnie. Ciekaw jestem czy Doktorantka ma jakąś koncepcję, która mogłaby stanowić uzasadnienie tych wyników.

Zastanawiająca jest także zbliżona bioróżnorodność we wszystkich badanych środowiskach, a zwłaszcza podobieństwa pomiędzy ogólnie glebami a ściekami. Ten wynik wydaje się wręcz nieprawdopodobny i moim zdaniem jest obarczony dużym błędem.

Bardzo dobrze oceniam prowadzenie przez Doktorantkę długofalowych eksperymentów dotyczących degradacji HZO przez skonstruowane konsorcja mikrobiologiczne. Badanie te prowadzono na bardzo wielu płaszczyznach. Udowodniono ubytek substancji macierzystej oraz pojawienie się metabolitów wtórnych Co ważne, Autorka wykazała, że mikroorganizmy pozostawały żywe i aktywne nawet po roku prowadzenia doświadczenia. Ciekawi mnie jednak dlaczego powtórne dodanie 2,4-D doprowadziło do śmierci wszystkich komórek. Bardzo proszę o próbę wyjaśnienia tej zadziwiającej sytuacji.

W dyskusji wyników dotyczących degradacji 2,4-D, Autorka pisze, że zaskakująca jest, Jej zdaniem, zdolność mikroorganizmów do degradacji tych związków z uwagi na krótki czas jaki upłynął od ich wprowadzenia na rynek (połowa XX wieku). Pozwolę sobie całkowicie się z tym stwierdzeniem nie zgodzić. Otóż dla bakterii szybko namnażających się, jak np. *Escherichia coli*, jedna nasza doba stanowi odpowiednik mniej więcej 2000 naszych lat. Nawet jeśli założymy, że inne bakterie żyją o połowę wolniej, to moim zdaniem miały ogrom czasu przez te około ludzkich 70 lat (nie wiem ile to bakteryjnych) na zmianę szlaków metabolicznych i wymianę materiału genetycznego.

Pracę kończy 8 wniosków przedstawionych przez Autorkę. Warto podkreślić trafność spostrzeżeń zawartych we wnioskach oraz ich zasadność.

Literatura z której korzystała Autorka jest bardzo bogata i obejmuje ponad 270 pozycji, dotyczących bardzo wielu aspektów związanych z prowadzonymi badaniami. Znaczna część pozycji została opublikowana w ostatniej dekadzie

Podsumowując stwierdzam, że cel rozprawy został zrealizowany i dobrze udokumentowany materiałem faktograficznym. Autorka wykazała znajomość problematyki jaką się zajmowała, udowodniła umiejętności prowadzenia badań i syntetycznej analizy wyników. Ponadto należy podkreślić także użyteczny charakter prowadzonych prac i wykazanie możliwości sterowania procesami rozkładu HZO za pomocą odpowiednio opracowanych i dobranych grup mikroorganizmów.

Najważniejszym osiągnięciem Doktorantki jest moim zdaniem interdyscyplinarność i użyteczność wykonanych badań oraz próba syntetycznej analiza uzyskanych wyników (pomimo drobnych trudności). Doktorantce udało się jednoznacznie udowodnić, że mikroorganizmy przekształcają HZO i są w stanie eliminować je ze środowiska, zwłaszcza po skonstruowaniu odpowiednich konsorcjów.

Poza tym chciałbym jeszcze raz zwrócić uwagę i szczególnie docenić ogrom i różnorodność badań, jakie zostały wykonane podczas realizacji prac.

Podsumowując stwierdzam, że zgodnie z wymogami ustawowymi oceniana rozprawa doktorska Pani mgr Poli Łomży-Kalinowskiej prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a Doktorantka posiada umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy badawczej.

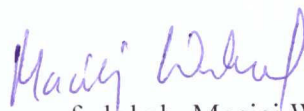
Praca przedstawia dużą wartość pod względem poznawczym, wnosi elementy nowości w zakresie biotransformacji i biodegradacji halogenowych związków organicznych. Cele badawcze postawione w pracy zostały w pełni osiągnięte, a wyniki zostały opublikowane w renomowanych czasopismach specjalistycznych z listy JCR.

Reasumując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane tego typu pracom zawarte w *art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz.U.2023.742 ze zm.)*.

Tym samym wnioskuję do Wysokiej Rady Biotechnologii Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Pani mgr Poli Łomży-Kalinowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto biorąc pod uwagę istotność prowadzonych badań dla ochrony środowiska i zdrowia nas wszystkich, szeroką paletę wykonanych analiz, ich poziom metodyczny, trudności wynikające z ilości uzyskanych wyników wnioskuję o wyróżnienie niniejszej pracy przez Wysoką Radę.

Toruń, 26.07.2024


prof. dr hab. Maciej Walczak