



prof. dr hab. Agnieszka Mrozik
Instytut Biologii, Biotechnologii
i Ochrony Środowiska
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Śląski w Katowicach

Katowice, dnia 30 lipca, 2024 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani **mgr inż. Poli Łomży-Kalinowskiej**

pt.: „**Mikrobiologiczna dehalogenacja – charakterystyka i zastosowanie bakterii
metabolizujących halogenowe związki organiczne**”

Podstawa prawna sporządzenia recenzji

Podstawą opracowania recenzji jest pismo Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Biotechnologia Politechniki Warszawskiej Pana prof. dr hab. Michała Chudego z dnia 18.06.2024 roku w sprawie powierzenia mi obowiązków recenzenta pracy doktorskiej Pani mgr inż. Poli Łomży-Kalinowskiej. Recenzję sporządziłam pod kątem spełnienia wymogów dla doktoratów określonych w art. 187 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.).

Ocena formalna

Praca doktorska Pani mgr inż. Poli Łomży-Kalinowskiej została wykonana w Zakładzie Biologii, na Wydziale Instalacji Budowlanych, Hydrotechniki i Inżynierii Środowiska Politechniki Warszawskiej, pod kierunkiem promotora Pani dr hab. inż. Agnieszki Tabernackiej, prof. uczelni. Przedstawiona do recenzji dysertacja została przygotowana w sposób klasyczny dla doktorskich prac eksperymentalnych i zawiera 6 podstawowych rozdziałów: wstęp, cel i zakres pracy oraz hipotezy badawcze, materiały i metody, wyniki i dyskusję, podsumowanie i wnioski. Dodatkowo praca zawiera streszczenie w języku polskim, streszczenie w języku angielskim, wykaz skrótów wraz z objaśnieniami, informacje o finansowaniu badań oraz spisy rysunków, tabel, fotografii i wzorów. Łącznie liczy 137 stron. Układ rozprawy doktorskiej jest przejrzysty i ma charakter bardzo profesjonalnie przygotowanego opracowania naukowego, podzielonego na logiczne i spójne rozdziały i podrozdziały.

Stwierdzam, że pod względem formalnym rozprawa doktorska Pani mgr inż. Poli Łomży-Kalinowskiej spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, składanym w podmiocie doktoryzującym w formie pisemnej monografii naukowej.

Ocena merytoryczna

W związku z powszechnością stosowania środków ochrony roślin (ŚOR) w rolnictwie, sadownictwie, czy w miejscach użytku publicznego wzrasta ryzyko systematycznego uwalniania i kumulowania się tych związków wraz z produktami ich transformacji w różnych elementach środowiska, tj. w glebie, wodzie, osadach dennych, powietrzu, a także w roślinach, organizmach zwierzęcych, żywności oraz organizmie ludzkim. Największe zagrożenie dla środowiska i człowieka stanowią pestycydy chloroorganiczne, które są bardzo stabilnymi związkami chemicznymi, trwałymi w środowisku i niezwykle odpornymi na naturalne procesy biodegradacji. Uznaje się, że im więcej podstawników chlorowych zawiera związek wyjściowy, tym jego toksyczność względem organizmów żywych jest większa, a podatność na biodegradację maleje. Ze względu na niski koszt i skuteczność działania, najbardziej powszechnymi w stosowaniu pestycydami w uprawach roślin są herbicydy z grupy kwasów fenoksykarboksylowych, w tym kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D). Znajduje się on w składzie ponad 40 preparatów dopuszczonych do obrotu i stosowania w Polsce i 1500 preparatów zarejestrowanych na świecie. Obecnie nie jest możliwe całkowite ograniczenie stosowania pestycydów chloroorganicznych, gdyż spełniają one nieocenioną rolę w ochronie upraw rolniczych i sadowniczych, ale ze względu na ich właściwości i wszechobecność należy koniecznie monitorować ich losy w różnych ekosystemach oraz podejmować konkretne działania zmniejszające ryzyko środowiskowe i zdrowotne. Dlatego też tematykę badawczą przedłożonej do recenzji pracy uważam za bardzo interesującą, nowatorską, aktualną i ważną w aspekcie zarówno badań podstawowych, jak i aplikacyjnych.

Pracę rozpoczyna Wstęp, będący bardzo treściwym wprowadzeniem do tematyki rozprawy. Tę część pracy można podzielić na trzy wątki tematyczne. W pierwszym Doktorantka dokonała szczegółowej charakterystyki halogenowych związków organicznych (HZO), ich właściwości fizykochemicznych, toksyczności, źródeł pochodzenia oraz zaprezentowała ważne informacje na temat pestycydów na bazie HZO. Drugi wątek tematyczny dotyczy różnych mechanizmów dehalogenacji z uwzględnieniem enzymów zaangażowanych w ten proces i powstających metabolitów. Natomiast w trzeciej części Autorka opisała różne metody bioremediacji naturalnej i inżynierskiej, i na wybranych przykładach z literatury przedstawiła wyniki prac nad redukcją zanieczyszczeń chlorowych w różnych ekosystemach. W podrozdziałach 1.6, poza zacytowanymi artykułami i pozycjami książkowymi w języku polskim, uwzględniłabym również dodatkowo prace następujących autorów: Vogel, 1996; [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(96\)80036-X](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(96)80036-X), Iwamoto i Nasu, 2001; [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(96\)80036-X](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(96)80036-X) i El Fantroussi i Agathos, 2005; <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.04.011>. Myślę, że nie powinno się o tych pracach zapominać, bo od nich bardzo wiele w tej tematyce się zaczęło. Mimo tej drobnej uwagi, uważam, że cały przegląd



literatury jest dobrym uzasadnieniem celu pracy, a zaprezentowane treści są dobrym wprowadzeniem do kolejnych rozdziałów pracy, w tym metodyki i podsumowującej pracę dyskusji wyników.

Głównymi celami rozprawy było zbadanie potencjału mikroorganizmów środowisk zbliżonych do naturalnych oraz antropogenicznie przekształconych do przeprowadzania procesu dehalogenacji halogenowanych związków organicznych (HZO) w oparciu o analizy metagenomowe oraz stworzenie prototypu biopreparatu przeznaczonego do redukcji zawartości HZO w środowiskach gruntowo-wodnych. W przypadku wielowątkowości badań dobrą praktyką jest zaprojektowanie graficznego planu badawczego z uwzględnieniem wszystkich etapów badań i prowadzonych analiz, co w niniejszej rozprawie znalazło odzwierciedlenie. Taki szczegółowy schemat znacznie lepiej wprowadza czytelnika w wielokierunkowy zakres prowadzonych prac i ułatwia śledzenie przebiegu kolejnych serii eksperymentów niż opis tekstowy (ten wydaje się zbędny). W moim odczuciu w pierwszej kolejności powinny być jednak zaprezentowane hipotezy badawcze, a dopiero potem powinny znaleźć się sprecyzowane szczegółowo działania zmierzające do ich weryfikacji. Sugeruję również zastanowienie się nad zwiększeniem zakresu (liczby) hipotez badawczych, bo realizacja 4 celów cząstkowych może dać również odpowiedź na inne, powiązane zagadnienia. Mimo tych uwag, ogólny cel pracy i zadania służące jego realizacji można uznać za bardzo ambitne i z sukcesem konsekwentnie etapowo realizowane.

Do realizacji postawionego celu Doktorantka wykorzystała szereg metod mikrobiologicznych, biochemicznych, genetycznych, chemicznych i fizycznych, stosownie do prowadzonych pomiarów i analiz. Bardzo dokładnie opisała skład podłoży hodowlanych, odczynniki, wszystkie zastosowane metody analityczne, narzędzia bioinformatyczne i testy ekotoksyczności z uwzględnieniem wszystkich szczegółów służących ich powtarzalności. Tę część pracy uważam za bardzo dobrze przygotowaną. Na podkreślenie zasługuje wykorzystanie w badaniach zaawansowanych procedur analitycznych, w tym emisyjnej spektrometrii atomowej ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-OES), chromatografii jonowej, chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas (LC-MS), chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS), czy sekwencjonowania DNA metodą Illumina. Za szczególnie cenne uważam również umiejętności Doktorantki w zakresie przeprowadzenia trudnych i czasochłonnych analiz bioinformatycznych, wymagających dużej wiedzy i doświadczenia.

Umiejętne zaplanowanie badań i konsekwentne ich realizowanie dostarczyło szeregu oryginalnych wyników istotnych pod względem poznawczym i aplikacyjnym. W rozdziale „Wyniki i dyskusja” Doktorantka zestawiała je w logiczny i bardzo przejrzysty sposób w 16 tabelach, na 10 wykresach, 3 rycinach i 3 fotografiach. Na szczególną pochwałę zasługuje bardzo estetyczny i staranny sposób ich wykonania. Sposób dyskusji wskazuje na dojrzałość naukową Doktorantki i

dobrą znajomość literatury światowej, dotyczącej prezentowanych zagadnień. Rozdział ten ukazuje Doktorantkę jako krytycznego obserwatora, zdającego sobie sprawę z wielu problemów metodycznych towarzyszących badaniom mikroorganizmów. Duże znaczenie dla mojej pozytywnej oceny doktoratu ma też wykonanie analizy korelacji opartej na analizie metagenomów, co dało podstawy do wysunięcia ciekawych wniosków.

W oparciu o przeprowadzone badania i analizy Autorka pracy sformułowała 8 obszernych wniosków, które właściwie są podsumowaniem otrzymanych wyników. Wniosek 8 jest raczej opinią z analizy danych uzyskanych z dwóch spółek dostarczających wodę do sieci wodociągowej. W moim odczuciu brakuje syntetycznych, jednozdaniowych wniosków, które uogólniłyby najważniejsze osiągnięcia pracy.

W podrozdziale „Spis literatury” zwraca uwagę imponująca liczba publikacji (254), obejmująca zarówno prace o znaczeniu historycznym, jak i te prezentujące najnowsze osiągnięcia. Pozycje literaturowe są właściwie dobrane do wprowadzenia w badany problem oraz oceny i konfrontacji otrzymanych wyników z wynikami innych autorów.

Najważniejsze osiągnięcia

Koncepcja badań oraz szeroki wachlarz metod badawczych umożliwiły uzyskanie cennych wyników, które poszerzają dotychczasowy stan wiedzy na temat mikrobiologicznej transformacji 2,4-D. Do najważniejszych osiągnięć dysertacji należą:

1. Potwierdzenie obecności genów zaangażowanych w biologiczne procesy dehalogenacji HZO w środowiskach zbliżonych do naturalnych oraz poddanych presji antropogenicznej.
2. Potwierdzenie obecności genów w metagenomach zaprojektowanych konsorcjów bakteryjnych, których produkty zaangażowane są w szlaki metabolizmu 2,4-D.
3. Udowodnienie, że preferowanym szlakiem transformacji 2,4-D przez wszystkie konsorcja bakteryjne jest szlak przebiegający przez 4-DCP, chociaż niektóre konsorcja posiadały również zdolność transformacji 2,4-D do 4-CP.
4. Przedstawienie dowodów na zwiększenie efektywności biotransformacji 4-CP przez bakterie poprzez suplementację hodowli etanolem i metylokobalaminą.
5. Udokumentowanie, że metabolity pośrednie powstające w procesie biotransformacji 2,4-D pozostają w środowisku wodnym i są silnie toksyczne dla organizmów wodnych i roślin wyższych.

W trakcie czytania i analizy pracy nasunęły mi się pewne pytania, które chciałabym zadać Doktorantce podczas obrony rozprawy doktorskiej:

1. Jaki rodzaj gleby reprezentowały próbki pobrane do badań? Czy istnieje związek między rodzajem gleby a tempem transformacji/biodegradacji związków chlorowcopochodnych? Jeśli tak, to proszę wyjaśnić tę zależność na wybranych przykładach.
2. Czy surfaktanty syntetyczne i biosurfaktanty mogą mieć wpływ na przebieg procesu transformacji/biodegradacji związków chlorowcopochodnych? Czy są na to jakieś dowody? Czy zamierza Pani zbadać produkcję biosurfaktantów przez mikroorganizmy w zaprojektowanych przez siebie konsorcjach? Jeśli tak, to jakimi metodami?
3. W jakim celu podczas selekcji bakterii heterotroficznych zdolnych do rozkładu HZO w czasie kolejnych trzech pasażów dodawano sterylne próbki gleby czy próbki osadu czynnego? W jaki sposób zabieg ten miał promować wzrost mikroorganizmów obecnych w podłożu?
4. Co Pani rozumie pod pojęciem „pełna transformacja” 2,4-D? Czy słowo „pełna” ma w tym przypadku swoje uzasadnienie?
5. Który z etapów analiz metagenomu okazał się najtrudniejszy i który Pani zdaniem ma kluczowe znaczenie w identyfikacji genów kodujących enzymy zaangażowane w przemianę 2,4-D?

Inne uwagi i sugestie natury szczegółowej:

- w przeciwieństwie do nazwy rodzajowej i gatunkowej bakterii pisanych kursywą, skrót sp. czy spp. piszemy prostym drukiem (np. str. 21, 69, 70, 96, 97)
- np. 0,025 g/l (str. 92) to nie ilość, a stężenie
- zauważyłam w spisie literatury brak następujących pozycji: EurEau, 2021; Mai i in., 2024; Balajee i Mahadevan, 1990; Benoit i in., 1996, cytowanych w tekście na stronach odpowiednio 16, 71, 97 i 98. W zapisie cytacji Kuppusamy (2017) i Pawlik (2017) brakuje i in. Zapis nazw czasopism powinien być również ujednolicony, albo pełne nazwy albo skróty, z kropkami lub bez, z podaniem tomu i stron. Nazwy rodzajowe i gatunkowe bakterii w tytułach artykułów wymagają zapisu kursywą. Mimo usilnych poszukiwań nie udało mi się również odnaleźć w tekście pozycji Gribble i in., (2018); Haggblom (1992); Europe's water in figures; Rejestr środków ochrony roślin dopuszczonych do obrotu zezwoleniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi; Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 1 września 2016 r.; Worldometers, mających swoją pozycję w spisie literatury. Być może mają one cytacje w tekście, ale w zapisie odmiennym niż w spisie literatury.
- wprowadzone skróty powinny być konsekwentnie używane w całej pracy, np. 4-CP w odniesieniu do 4-chlorofenolu i *p*-chlorofenolu, czy np. HTG.
- usterki redakcyjne, interpunkcyjne i stylistyczne oraz powtórzenia podobnych treści są nieliczne w tak obszernym opracowaniu i nie mają istotnego wpływu na percepcję tekstu przez czytelnika.

Moje uwagi krytyczne i sugestie nie umniejszają absolutnie pozytywnej oceny wartości naukowej pracy, ale mogą ewentualnie być pomocne podczas przygotowania manuskryptów do druku.

Ocena końcowa pracy

Uzyskane wyniki stanowią niewątpliwie oryginalne i cenne osiągnięcie naukowe Doktorantki w zakresie mikrobiologii, genetyki molekularnej i biotechnologii środowiskowej. Doktorantka zaprezentowała bardzo dobre przygotowanie teoretyczne w zakresie badanych zagadnień i przeprowadziła wieloaspektowe, czasochłonne eksperymenty wymagające doświadczenia z zakresu stosowanych metod tradycyjnych, molekularnych i bioinformatycznych. Wykazała, że potrafi rozwiązywać problemy naukowe, posiada odpowiedni warsztat badawczy oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy badawczej. Uważam, że rozprawa zawiera elementy nowości, które nie tylko wzbogacają i pogłębiają dotychczasową wiedzę o mechanizmach mikrobiologicznej transformacji/biodegradacji toksycznych i niebezpiecznych zanieczyszczeń z podstawnikiem chlorowym, ale także mogą stanowić podstawę do opracowania na większą skalę nowej technologii i wdrożenia jej do rewitalizacji/rekultywacji terenów zanieczyszczonych tymi związkami. Na podkreślenie zasługuje również pozyskanie przez Doktorantkę funduszy zewnętrznych na przeprowadzenie badań w ramach grantu Preludium NCN nr 2019/33/N/NZ9/01404 pt. „Badanie potencjału zespołu mikroorganizmów do przeprowadzania dehalogenacji naturalnych i antropogenicznych halogenowych związków organicznych”.

Z recenzenckiego obowiązku chciałam jednak zwrócić uwagę na poważne uchybienie ze strony Doktorantki i niedochowanie należytej staranności w odniesieniu do części tych samych wyników i materiałów ilustracyjnych prezentowanych w pracy doktorskiej i opublikowanych w artykule autorstwa Łomża P., Krucoń T., Tabernacka A. 2023. Potential of microbial communities to perform dehalogenation processes in natural and anthropogenically modified environments – a metagenomic study. *Microorganisms*, 11(7), 1702. Doktorantka jest pierwszym i korespondencyjnym autorem tej pracy i Jej wkład w powstanie artykułu był niewątpliwie wiodący. W świetle ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce oraz Komunikatu Rady Doskonałości Naukowej nr 19/2020 - w sprawie składania rozpraw doktorskich dopuszczalne jest, aby rozprawa doktorska, jako praca pisemna, składała się z prac opublikowanych, jak i takich, których wyniki jeszcze nie zostały opublikowane. Nieuwzględnienie w doktoracie opublikowanych wyników badań nie zwalnia jednak moim zdaniem Doktorantki z obowiązku zacytowania w/w pracy w odpowiednich rozdziałach rozprawy doktorskiej. Innym, dobrym rozwiązaniem mogło być załączenie oryginalnej postaci artykułu w tekście rozprawy z opisem celu podjętych prac eksperymentalnych, wskazaniem ich nowatorskiego charakteru oraz wykazem najważniejszych osiągnięć naukowych. Podobnie wiele fragmentów tekstu we wstępie pracy doktorskiej pochodzi z

dwóch artykułów przeglądowych autorstwa Doktorantki i Promotora, opublikowanych przez Wydawnictwo Naukowe Tygiel, które również nie zostały zacytowane. Dotyczy to szczególnie mechanizmów dehalogenacji, opisywanych w artykule: Łomża P., Tabernacka A. Mikrobiologiczne procesy dehalogenacji związków organicznych, 2019, 137-146 oraz metod bioremediacji środowiska zanieczyszczonego HZO prezentowanych w artykule: Łomża P., Tabernacka A. Zastosowanie procesów mikrobiologicznej dehalogenacji związków organicznych w inżynierii środowiska”, 2019, 129-136. Prosiłabym Doktorantkę o dokładne wyjaśnienie, dlaczego tak się stało.

Wniosek końcowy

Reasumując, stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Poli Łomży-Kalinowskiej pt. „Mikrobiologiczna dehalogenacja – charakterystyka i zastosowanie bakterii metabolizujących halogenowe związki organiczne” spełnia warunki określone w art. 187 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). Stanowi ona cenny wkład w rozwój nowoczesnych metod biologicznych do remediacji środowisk o dużym stopniu zanieczyszczenia związkami z podstawnikiem chlorowym. Przedłożona przez Doktorantkę praca świadczy o Jej naukowej dojrzałości, praktycznej znajomości metod badawczych oraz obszernej wiedzy teoretycznej związanej z podjętymi zagadnieniami. Dodatkowo należy podkreślić, że uzyskane w pracy wyniki mają nie tylko wartość poznawczą, ale również aplikacyjną. Na tej podstawie składam wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny Biotechnologia Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie mgr inż. Poli Łomży-Kalinowskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

