

Łódź, 08.08.2024

Dr hab. inż. Olga Marchut-Mikołajczyk, prof. uczelni
Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Poli Łomży-Kalinowskiej

Pt. „Mikrobiologiczna dehalogenacja - charakterystyka i zastosowanie bakterii metabolizujących halogenowane związki organiczne”.

Rozprawa doktorska Pani mgr Poli Łomży-Kalinowskiej zatytułowana „Mikrobiologiczna dehalogenacja - charakterystyka i zastosowanie bakterii metabolizujących halogenowane związki organiczne”, została wykonana w Zakładzie Biologii, na Wydziale Instalacji Budowlanych, Hydrotechniki i Inżynierii Środowiska, Politechniki Warszawskiej, pod kierunkiem dr hab. inż. Agnieszki Tabernackiej, prof. uczelni.

Głównym celem rozprawy było wykorzystanie analiz metagenomicznych do oceny potencjału mikroorganizmów obecnych zarówno w środowiskach zbliżonych do naturalnych jak i przekształconych antropogenicznie do prowadzenia procesu dehalogenacji halogenowanych związków organicznych (HZO). Ponadto, wyselekcjonowane mikroorganizmy wyizolowane z badanych środowisk wykorzystano do utworzenia czterech konsorcjów bakteryjnych, które wykorzystano w testach symulacyjnych biotransformacji kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D) i 4-chlorofenolu (4-CP), celem stworzenia prototypu biopreparatu przeznaczonego do usuwania HZO w środowiskach gruntowo-wodnych.

Tematyka badawcza podjęta w przedstawionej do recenzji rozprawie nawiązuje do aktualnych trendów badawczych związanych z poszukiwaniem ekologicznych i efektywnych metod usuwania zanieczyszczeń ze środowiska. Halogenowane związki organiczne (HZO) stanowią szeroko rozpowszechnione w środowisku toksyczne, rakotwórcze substancje chemiczne. Ich wpływ na środowisko jest silnie negatywny ze względu na ich właściwości fizykochemiczne, które zawdzięczają podstawnikom halogenowym: fluorowi, chlorowi, bromowi i jodowi. Ponadto HZO są trwałe, co sprawia, że są odporne na degradację, co skutkuje ich akumulacją w środowisku, a rosnące poziomy HZO w środowisku (tj. powietrzu, wodzie, glebie, osadach) oraz w tkankach ludzkich, w tym w tkance tłuszczowej, mleku matki i łożysku, w dalszym ciągu stanowią przyczynę problemów ekologicznych i zdrowotnych ludzi. Interesujący jest fakt, że związki te są obecne od czasu pojawienia się życia na Ziemi i wszystkie dane pokazują, że wcześniej ich obecność nie stanowiła problemu ekologicznego. Problem polega na tym, że w przypadku ksenobiotyków (antropogennych), a nie naturalnych halogenków organicznych, ich produkcja znacznie

wzrosła w ciągu ostatnich dziesięcioleci. Mimo ograniczenia stosowania starszych rodzajów HZO, takich jak na przykład polichlorowane bifenyle (PCB), systematycznie wzrasta zużycie halogenowanych związków organicznych nowej generacji, takich jak polibromowane etery difenyłowe (PBDE) i substancje perfluoroalkilowe (PFAS). Ich stosowanie i często niewłaściwe użycie w przemyśle i rolnictwie powoduje, że duże ilości tych związków przedostają się do środowiska, skutkując jego skażeniem.

Mikroorganizmy są głównymi mediatorami obiegu halogenowanych związków organicznych w środowisku. Jednak mikrobiologiczna degradacja halogenowanych zanieczyszczeń organicznych jest często nieefektywna. Nie tylko szybkość degradacji jest niska, ale czasami wytwarzane są bardziej toksyczne substancje. Dlatego też istotne jest pełne określenie i zrozumienie różnorodnych ról mikroorganizmów w procesach biodegradacji i biotransformacji.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska wpisuje się w wyżej opisany trend badawczy. Jest przykładem wykorzystania badań metagenomicznych nie tylko do scharakteryzowania różnorodności gatunkowej i potencjału metabolicznego mikroorganizmów do prowadzenia procesu dehalogenacji, ale również do celowego skonstruowania konsorcjów bakteryjnych zdolnych do biotransformacji wybranych chlorowanych pestycydów. Takie podejście zwiększa efektywność skringingu i skraca czas opracowywania biopreparatów wykorzystywanych do oczyszczania środowiska.

Ocena formalna pracy

Rozprawa liczy 137 stron tekstu. Układ przedstawionej do oceny rozprawy jest typowy i zawiera: wstęp, cel i zakres pracy oraz hipotezy badawcze, opis materiałów i metod, wyniki i dyskusję, podsumowanie, wnioski, spis literatury, spis figur, wykaz skrótów oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Cytowane piśmiennictwo obejmuje 246 pozycji literatury, w tym 237 w języku angielskim, co stanowi 96 %. Literatura z ostatnich 5 lat stanowi około 8% ~~procent~~ (21 pozycji). Dobór literatury jest uzasadniony i obejmuje najważniejsze pozycje w zakresie podejmowanej tematyki. Jednakże biorąc pod uwagę dużą liczbę prac naukowych z podjętego zakresu badawczego należy stwierdzić, że bibliografię należałoby uzupełnić o nowsze pozycje literaturowe, by przegląd literaturowy oddawał aktualny stan wiedzy. W spisie literatury część pozycji wymaga korekty edytorskiej, w tym m. in: pisownia nazw gatunkowych powinna być zapisana kursywą (np Yanagida i in., 2016; Wu i in., 2017; Suwa i in., 1996; Jacobsen i in., 1992; etc). W spisie treści brakuje obecnych w rozprawie: Spisu wykresów; Spisy rycin; Spisu fotografii oraz Spisu wzorów.

Ocena merytoryczna rozprawy

W części literaturowej Doktorantka przedstawiła zagadnienia związane z ogólną charakterystyką halogenowanych związków organicznych (HZO), ze szczególnym uwzględnieniem pestycydów, przemianami HZO w środowisku, potencjałem mikroorganizmów do usuwania tej grupy związków jak również metabolizmem HZO. W tej części pracy można znaleźć pewne nieścisłości.

Na przykład na stronie 19, Doktorantka, powołując się na literaturę wskazuje, że HZO z wieloma podstawnikami, między innymi polichlorowane bifenyle (PCBs) czy polihalogenowane dioksyny są metabolizowane jedynie w warunkach beztlenowych na drodze dehalorespiracji, podczas gdy w środowisku można znaleźć mikroorganizmy tlenowe wykazujące zdolność do rozkładu tych związków. Zaskakujące jest również to, że przy omawianiu szlaków metabolicznych halogenowanych związków organicznych Doktorantka nie zamieściła ani jednego rysunku/ schematu, który znacznie ułatwiłby odbiór pracy. W ostatnich dwóch podrozdziałach części literaturowej Doktorantka przedstawiła zagadnienia związane z biologicznymi procesami oczyszczania środowisk zanieczyszczonych oraz perspektywy możliwości zastosowania bioremediacji do usuwania HZO ze środowiska. Te dwa podrozdziały opisane są bardzo ogólnikowo i zawierają pewne niejasności, np. przytoczona przez Doktorantkę na stronie 27 definicja bioreaktora „*Bioreaktory (fermentatory) to urządzenia wyposażone w naczynia, system wirników oraz sond mających zapewnić odpowiednie warunki natlenienia, obiegu nutrientów, temperatury, w których zachodzą procesy mikrobiologiczne, prowadzące do degradacji i transformacji zanieczyszczeń*” nie jest definicją stosowaną w biotechnologii, a przytoczone przez Doktorantkę słowo „fermentator” jako słowo zastępujące bioreaktor nie funkcjonuje w nomenklaturze naukowej.

W drugim rozdziale Doktorantka przedstawiła cel główny oraz cele cząstkowe pracy oraz sformułowała dwie hipotezy badawcze. Ponadto szczegółowo przedstawiła zakres pracy. Sprzeciw Recenzenta budzi jednak sformułowanie „Identyfikacja białek wydzielniczych produkowanych przez konsorcja w symulacjach biotransformacji 2,4-D oraz 4-chlorofenolu (...)”. W odniesieniu do procesów biotransformacji należało użyć terminu „enzymy”.

W trzecim rozdziale Pani mgr Pola Łomża- Kalinowska przedstawiła część doświadczalną obejmującą szczegółowy opis siedmiu etapów przeprowadzonych doświadczeń oraz schemat przeprowadzonych badań, który znacznie ułatwia odbiór pracy. Ta część rozprawy zawiera również szczegółowy opis odczynników, materiałów analitycznych i biologicznych oraz metod wykorzystanych w pracy badawczej.

W rozdziale Wyniki i dyskusja zawarto wyniki wszystkich eksperymentów przeprowadzonych w ramach pracy, poczynając od analiz fizykochemicznych prób środowiskowych, które poddano analizom metagenomicznym, poprzez analizę składów taksonomicznych analizowanych środowisk oraz analizę metagenomów próbek środowiskowych pod kątem występowania genów kodujących dehalogenazy, aż do ich zastosowania do opracowania konsorcjów bakterii efektywnych w biotransformacji badanych pestycydów. **Cennym z poznawczego punktu widzenia jest analiza metagenomiczna środowisk naturalnych oraz środowisk poddanych antropopresji pod kątem mikroorganizmów genów kodujących dehalogenazy, enzymy niezbędne w procesach dehalogenacji i skorelowanie występowania genów kodujących te enzymy z obecnością HZO w środowisku. Należy również podkreślić potencjał aplikacyjny otrzymanych wyników, gdyż opracowane w ramach rozprawy konsorcja bakteryjne wykazują wysoki potencjał do biotransformacji wybranych halogenowanych pestycydów oraz 4-chlorofenolu (4-CP).**

Wyniki stanowią odpowiednią podstawę do wysunięcia wniosków, cennych zarówno z naukowego jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Jednakże niektóre elementy wymagają

komentarzy i wyjaśnień, które Kandydatka mogłaby zaprezentować jest ~~proszona~~ podczas publicznej obrony pracy doktorskiej.

1. Czy roztwory soli dodawane do podłoża mineralnego M9 po jego sterylizacji były sterylne?
2. W jakim celu oliwę z oliwek wykorzystywaną do oznaczenia aktywności lipolitycznej oczyszczano poprzez przepuszczenie przez kolumnę wypełnioną aktywowanym tlenkiem glinu w mieszaninie rozpuszczalników (str. 38)?
3. Proszę wyjaśnić czym jest jodyna Grama (str. 53)?
4. Co oznacza sformułowanie „hodowla nocna badanego szczepu bakterii (str. 53)?
5. Strona 54: na jakiej podstawie wybrano do badań symulacji biotransformacji kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D) stężenia 16 g/l, 8 g/l, 4,2 g/l, 2,1 g/l ?
6. Strony 54 i 55: dlaczego hodowle prowadzono przy szybkości 120 rpm, podczas gdy wcześniej hodowle w ramach selekcji bakterii prowadzone były z wytrząsaniem 130 rpm? Jaki był czas symulacji procesów biotransformacji?
7. Strony 80-82: w jakim celu charakteryzowano badane szczepy bakterii pod kątem zdolności do produkcji celulaz, lipaz i ureaz skoro nie analizowano zmian aktywności tych enzymów ani ich wpływu na proces biotransformacji badanych HZO?
8. *Jedno z konsorcjów dodatkowo jest również przystosowane do biodegradacji produktów ropopochodnych, zatem może być wykorzystane w warunkach współistnienia zanieczyszczeń produktami ropopochodnymi.* Czy Doktorantka uważa, że na podstawie wyników przeprowadzonych przez nią badań, takie stwierdzenie jest zasadne?
9. Jaka jest opinia Doktorantki, jakie metody/techniki należałoby zastosować by zminimalizować ryzyko pozostawiania metabolitów pośrednich biotransformacji 2,4 D w środowisku wodnym?

Ocena końcowa

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Poli Łomży-Kalinowskiej, pt. „Mikrobiologiczna dehalogenacja- charakterystyka i zastosowanie bakterii metabolizujących halogenowane związki organiczne”, wykonana pod kierunkiem dr hab. inż. Agnieszki Tabernackiej, prof. uczelni jest wartościowym opracowaniem. Zawarte w niej wyniki są źródłem wiedzy o charakterze naukowym jak i aplikacyjnym, na temat możliwości wykorzystania mikroorganizmów do usuwania halogenowanych związków organicznych ze środowiska. Poruszony temat jest rozwojowy i może być przedmiotem pogłębionych badań. Doktorantka poprawnie sformułowała cel i zakres pracy oraz postawiła właściwe hipotezy badawcze, właściwie zaplanowała i zrealizowała prace eksperymentalne, umiejętnie wykorzystwała narzędzia badawcze i analityczne zarówno z dziedziny biotechnologii, jak i chemii. Uzyskane wyniki zostały poddane krytycznej analizie i odpowiednio skomentowane.

Przedłożoną do recenzji rozprawę oceniam pozytywnie i stwierdzam, że rozprawa ta spełnia wszystkie ustawowe wymogi i kryteria określone w art 187 Ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z dnia 20 lipca 2018 roku. Wnoszę do Rady do Spraw Stopni Naukowych w dyscyplinie Biotechnologia Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie ocenianej rozprawy do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Omarclut Młotczyński