



Zakład Genetyki Bakterii

prof. dr hab. Dariusz Bartosik
Zakład Genetyki Bakterii
Instytut Mikrobiologii
Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski

Warszawa, 25.06.2016

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Justyny Małgorzaty Drewnowskiej, zatytułowanej
„*Genetic structure of environmental Bacillus cereus sensu lato strains isolated from
Northeastern Poland*”**

Przedstawiona do oceny rozprawa została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku, pod kierunkiem dr hab. Izabeli Świącickiej, prof. UwB. Rozprawę tę przygotowano w języku angielskim, zgodnie z wymogami stosownej ustawy. Ma ona formę spójnego tematycznie zbioru trzech artykułów opublikowanych w latach 2013-2015 w międzynarodowych czasopismach naukowych, indeksowanych w bazie JCR (*Journal Citation Reports*), o sumarycznym współczynniku oddziaływania (Impact Factor; IF) 10,643.

Pierwsza praca ukazała się w czasopiśmie *FEMS Microbiology Ecology* w 2013 roku (85, 262-72), a dwie kolejne w czasopiśmie *PLoS ONE*, odpowiednio w 2013 (8, e80175) i 2015 roku (10, e0125428). Prace te zostały przedstawione w rozprawie chronologicznie, według dat ich opublikowania. Wszystkie one są wieloautorskie – pierwsza praca liczy ośmiu, druga dwóch, a trzecia pięciu współautorów. Należy zaznaczyć, że Doktorantka jest pierwszym autorem dwóch artykułów, a w jednym z nich jedynym współautorem jest promotor rozprawy, prof. Izabela Świącicka. Do rozprawy doktorskiej dołączono oświadczenia wszystkich współautorów publikacji, z których wynika, że Doktorantka miała udział dominujący (w artykułach 2 i 3) bądź znaczący (w artykule 1) w powstaniu i opublikowaniu przedłożonych prac.

Przedstawione w rozprawie badania zaplanowano z myślą o weryfikacji koncepcji Fredericka Cohana, według której każdy gatunek bakterii stanowi zbiór różnych ekotypów, definiowanych jako homogenne grupy bakterii, charakteryzujące się wysokim stopniem podobieństwa ekologicznego. Poszczególne ekotypy wykazują odmienne właściwości o charakterze adaptacyjnym, które warunkują lepsze dostosowanie bakterii do warunków zasiedlanego środowiska. Identyfikacja i charakterystyka ekotypów, stanowiących podstawową jednostkę specjacji ekologicznej, jest ważnym zadaniem badawczym, przynoszącym ciekawe informacje nie tylko na temat stopnia zróżnicowania genetycznego i

fenotypowego w obrębie danego gatunku, lecz także o środowisku bytowania bakterii, które wywiera presję selekcyjną specyficzne warianty genetyczne.

Doktorantka postawiła sobie za cel uzyskanie odpowiedzi na pytanie, czy naturalne populacje bakterii z grupy *Bacillus cereus sensu lato*, stanowiące istotny komponent mikrobiomu gebowego, wykazują charakter ekotypowy. Bakterie te od wielu lat niezmiennie znajdują się w centrum zainteresowań naukowych, ze względu na ich właściwości, powszechność występowania w środowisku naturalnym oraz wpływ jaki wywierają na jego ukształtowanie. Należy pokreślić, że rozprawa ta wpisuje się w szerszy kontekst badań prowadzonych w Zakładzie Mikrobiologii UwB, gdzie w pod kierunkiem prof. Izabeli Świącickiej powstało wiele wartościowych prac naukowych, dotyczących, ogólnie ujmując, biologii bakterii z grupy *B. cereus*.

W pierwszej włączonej do rozprawy pracy, zatytułowanej "*Diversity of thermal ecotypes and potential pathotypes of Bacillus thuringiensis soil isolates*", analizom poddano 49 szczepów bakterii *Bacillus thuringiensis*, wyizolowanych z próbek gleby pochodzących z 3 odległych punktów geograficznych. Dwadzieścia pięć szczepów pochodziło z Narwiańskiego Parku Narodowego, a pozostałe z dwóch odległych miejsc w północno- i południowo-wschodniej Litwy. Szczepy te zaliczono do gatunku *B. thuringiensis* na podstawie ich charakterystycznych cech, tj. wzrostu na odpowiednich podłożach selekcyjno-różnicujących oraz zdolności do wytwarzania kryształów toksyny.

W kolejnym etapie zbadano stopień zróżnicowania szczepów (i) na poziomie genetycznym, poprzez analizę porównawczą sekwencji wybranych genów metabolizmu podstawowego, (ii) na poziomie genomowym, poprzez analizę wzorów restrykcyjnych genomowego DNA, uwidocznionych w wyniku elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (PFGE), oraz (iii) na poziomie fenotypowym, poprzez zbadanie właściwości psychrotolerancyjnych oraz detekcję genów kodujących różnego typu toksyny.

Przeprowadzone badania dowiodły dużego zróżnicowania genetycznego szczepów *B. thuringiensis* oraz wskazały na częste występowanie w tym gatunku ekotypów o właściwościach psychrotolerancyjnych. Potwierdziły one tym samym wcześniejsze obserwacje, wskazujące na to, że pule izolatów tego gatunku stanowią odrębne grupy filogenetyczne, charakteryzujące się specyficznymi właściwościami o charakterze przystosowawczym.

Chociaż Doktorantka zajmuje 4 pozycję wśród współautorów tej pracy, należy podkreślić, że jej wkład w badania był bardzo znaczący. Zadaniem Doktorantki była analiza właściwości psychrotolerancyjnych wszystkich izolatów pochodzących z terenu Polski (tj. 25 szczepów), a także detekcja w tych bakteriach genów endotoksyn i cytotoksyny K. Doktorantka uczestniczyła także w analizie danych i redagowaniu manuskryptu tej pracy.

Badania przedstawione w drugiej z opublikowanych prac, zatytułowanej "*Eco-genetic structure of Bacillus cereus sensu lato populations from different environments in northeastern Poland*", przeprowadzono według analogicznego schematu eksperymentalnego. W tym przypadku poddano jednak analizom znacznie większą pulę szczepów, reprezentujących różne gatunki z grupy *B. cereus*. Scharakteryzowano łącznie 273

izolaty pochodzące z trzech zróżnicowanych środowisk północno-wschodniej Polski – z terenów bagiennych (Biebrzański Park Narodowy), leśnych (Białowiecki Park Narodowy) i rolniczych (gospodarstwo rolne w Jesionówce). Na podstawie przeprowadzonych testów, zaklasyfikowano je do odpowiednich gatunków. W pierwszym etapie prac przeprowadzono genotypowanie zgromadzonej puli izolatów metodą MLST (ang. *multi-locus sequence typing*), analizując sekwencje siedmiu genów niezbędnych do przeprowadzenia podstawowych procesów życiowych bakterii. Analiza porównawcza tych sekwencji przyniosła ogólny wgląd w strukturę genetyczną populacji bakterii oraz pozwoliła na przeprowadzenie analiz filogenetycznych, które doprowadziły do wyróżnienia czterech kładów, częściowo skorelowanych z miejscem izolacji poszczególnych grup szczepów. Analizy te dopełniono przeprowadzając detekcję genów delta-endotoksyn i cytotoksyny K oraz określając psychrotolerancyjne właściwości poszczególnych szczepów.

W trakcie badań uzyskano dużą ilość danych, które zaprezentowano w pracy w sposób syntetyczny i przemyślany. Uzyskane wyniki dowiodły istnienia wśród naturalnych populacji *B. cereus sensu lato* odrębnych genotypów, które są prawdopodobnie wynikiem adaptacji tych bakterii do specyficznych środowisk bytowania. Należy zaznaczyć, że Doktorantka wykonała samodzielnie całą część eksperymentalną tej pracy, a także uczestniczyła, wraz ze swoim promotorem, we wszystkich etapach przygotowywania jej do druku.

Przyczynkiem podjęcia badań opisanych w trzecim artykule rozprawy, zatytułowanym "*Melanin like pigment synthesis by soil Bacillus weihenstephanensis isolates from northeastern Poland*", była obserwacja wskazująca, że kilka szczepów z licznej, liczącej ponad 900 izolatów kolekcji bakterii z grupy *B. cereus*, wykazywało zdolność wytwarzania i uwalniania do podłoża barwników o specyficznym zabarwieniu. Scharakteryzowano te szczepy, klasyfikując je do gatunku *Bacillus weihenstephanensis*, a także zdefiniowano wytwarzany barwnik wykazując, że jest to związek melanino-podobny. W toku badań zaproponowano prawdopodobne ścieżki syntezy tego barwnika, a analizując jego właściwości wykazano, że, w przeciwieństwie do komercyjnie dostępnej melaniny, związek ten jest rozpuszczalny w wodzie, co predestynuje go do zastosowań biotechnologicznych. Ciekawą obserwacją było także stwierdzenie, że wytwarzanie tych związków jest ściśle skorelowane z miejscem izolacji szczepów, co sugeruje, że zaobserwowany fenotyp, z którym skorelowane są także właściwości psychrotolerancyjne, może warunkować lokalną adaptację bakterii do określonych nisz ekologicznych. Zidentyfikowano i scharakteryzowano zatem kolejny ekotyp *B. cereus sensu lato*, co wpisuje się w myśl przewodnią ocenianej rozprawy.

Należy podkreślić, że praca dotycząca wytwarzania pigmentów powstała w wyniku realizacji kierowanego przez Doktorantkę projektu badawczego, który uzyskał finansowanie NCN w konkursie Preludium.

Analizując poszczególne publikacje zwróciłem uwagę na wzrastający udział Doktorantki w każdej kolejnej pracy – począwszy od roli wykonawcy (w pracy nr 1), poprzez równorzędnego partnera swojego opiekuna naukowego (w pracy nr 2), a skończywszy na stworzeniu koncepcji badań i kierowaniu tematem w ramach własnego projektu badawczego

(praca nr 3). Doskonale ilustruje to właściwy rozwój naukowy Doktorantki, która w końcowym etapie studiów wydaje się już być dojrzałym i samodzielnym młodym badaczem.

Pod względem redakcyjnym rozprawa została przygotowana wręcz wzorowo. Trzy zamieszone w niej publikacje zostały poprzedzone streszczeniem, w języku polskim i angielskim, oraz wstępem, który poruszając wątki dotyczące koncepcji ekotypów oraz klasyfikacji taksonomicznej bakterii z grupy *B. cereus sensu lato*, stanowi zwięzłe i w pełni wystarczające wprowadzenie do poruszanej w rozprawie tematyki. W końcowej części zamieszczono podsumowanie, a także wypunktowane konkluzje oraz oświadczenia współautorów, określające ich udział w pracach badawczych. Bardzo trafnym posunięciem było postawienie w ocenianej rozprawie trzech hipotez badawczych, których weryfikacja stanowiła w istocie przewodni cel naukowy przeprowadzonych badań. Zamiast ogólnikowych punktów podsumowania, czytelnik otrzymuje więc ciekawe, zwięzłe przedstawione rozważania, których lektura przekonuje zarówno o rozległej wiedzy Doktorantki, jak i umiejętności dokonania przez nią syntezy uzyskanych wyników i przedstawienia ich w szerszym kontekście. Pozwoliło to na sformułowanie wartościowych wniosków na temat ewolucji i adaptacji bakterii z grupy *B. cereus* do specyficznych środowisk glebowych, podlegających zróżnicowanemu wpływowi presji antropogenicznej.

Wszystkie artykuły zostały już opublikowane, podlegały więc wcześniej wnikliwej i rygorystycznej recenzji wymagających specjalistów i edytorów naukowych, co niewątpliwie ułatwia pracę recenzentowi rozprawy, jednak nie zwalnia go od obowiązku dokonania własnej analizy i oceny. W trakcie lektury wynotowałem kilka pytań i uwag, które niżej przedstawiam:

Praca nr 1.

Do pracy tej mam trzy drobne uwagi. Po pierwsze, w rozdziale Materiały i Metody występuje pewna nieścisłość dotycząca liczby analizowanych szczepów – podano, że jest ich 49, podczas gdy ich suma wynosi 50. Po drugie, zwracam uwagę na symbol oznaczający Narwiański Park Narodowy na ilustracji nr 1, który nie jest identyczny z symbolem zamieszczonym w opisie tej figury. Trzecia uwaga dotyczy ilustracji nr 2, przedstawiającej dendrogram oraz charakterystykę analizowanych szczepów w odniesieniu do 10 szczepów referencyjnych. Z uwagi na dużą ilość przedstawionych w niej danych uważam, że korzystne byłoby graficzne wyróżnienie w dendrogramie szczepów referencyjnych, co znacznie ułatwiłoby czytelnikowi przeprowadzenie analizy porównawczej.

Praca nr 2.

Wykorzystując technikę PCR, w puli szczepów identyfikowano gen cytotoksyny K (*cytK*), a następnie, stosując PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR), poszukiwano informacji na temat ekspresji tego genu w komórkach macierzystych szczepów. Z przedstawionych danych wynika, że gen ten wykryto w 23 izolatach, jednak obecność transkryptu stwierdzono jedynie w 8 z nich. Moje pytanie dotyczy zasadności przeprowadzania analiz RT-PCR w przypadku izolatów środowiskowych, gdy nie znamy pełnych sekwencji nukleotydowych analizowanych

genów. Analiza ta opiera się zatem jedynie na domniemaniu identyczności sekwencji (komplementarnych do zastosowanych starterów), dlatego też jej negatywny wynik nie wyklucza jednoznacznie obecności transkryptu w komórce. Chętnie poznam opinię Doktorantki na ten temat.

W pracach nr 1 i nr 2 badano zdolność bakterii do wzrostu w różnych temperaturach, co pozwoliło na identyfikację ekotypów psychrotolerancyjnych, rosnących w temp. 7°C. W pracy nr 1 testowano również wzrost bakterii w temperaturze 43°C, co stanowiło dodatkowy czynnik różnicujący analizowane szczepy (część z nich nie była zdolna do wzrostu w tych warunkach). W pracy nr 2, w analogicznych badaniach zastosowano wyższą temperaturę (50°C), w której nie zaobserwowano wzrostu żadnego z analizowanych szczepów. Moje pytanie dotyczy zasadności zmiany tego parametru hodowli. Być może temp. 50°C stanowi barierę dla wzrostu wszystkich szczepów z grupy *Bacillus cereus sensu lato*? Jakie są dane literaturowe na ten temat?

Praca nr 3.

W pracy tej scharakteryzowano pigment o potencjale aplikacyjnym. Ciekawi mnie, czy, w związku z tym, podjęto jakieś kroki zmierzające do objęcia analizowanych szczepów-producentów ochroną patentową.

Interesujący wątek tej pracy dotyczył próby określenia przebiegu ścieżek metabolicznych warunkujących syntezę melaniny. Przeprowadzone badania przyniosły pewne informacje na ten temat, które jednak powinny zostać zweryfikowane w toku dalszych, bardziej szczegółowych analiz. W pracy tej odczytano sekwencję nukleotydową genomu jednego ze szczepów wytwarzających pigment. Opis tego genomu jest bardzo zwięzły i ogranicza się niemal wyłącznie do identyfikacji genu lakazy, co jest zrozumiałe, biorąc pod uwagę zasadniczy cel przeprowadzonego sekwencjonowania. Korzystając z okazji, poprosiłbym jednak o podanie, w trakcie obrony rozprawy, nieco więcej informacji na temat tego genomu, w odniesieniu do genomów innych szczepów z tego gatunku.

Kończąc recenzję podkreślę, że oceniana rozprawa prezentuje wysoki poziom naukowy. Przeprowadzono w niej kompleksowe analizy genetyczne, fenotypowe i biochemiczne znacznej puli bakterii, które przyniosły wiele oryginalnych i wartościowych danych na temat struktury genetycznej oraz ekologicznej specjacji bakterii z grupy *B. cereus sensu lato*. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wnoszą również ważne myśli do toczącej się obecnie dyskusji na temat taksonomii tych bakterii, która wciąż budzi wśród badaczy wiele kontrowersji. Jestem przekonany, że opublikowane wyniki tej rozprawy znajdą oddźwięk w pracach innych badaczy, prowadzących badania m.in. z zakresu mikrobiologii środowiskowej oraz ekologii i ewolucji mikroorganizmów.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę Doktorantki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia przez nią badań naukowych. We włączonych do rozprawy

trzech oryginalnych współautorskich pracach badawczych Doktorantka pełni znaczącą bądź dominującą rolę, co w pełni uzasadnia wniosek o nadanie Jej stopnia naukowego doktora nauk biologicznych. Wnoszę więc do Rady Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku o dopuszczenie mgr Justyny M. Drewnowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, z uwagi na wysoką wartość merytoryczną uzyskanych wyników oraz ich opublikowanie w uznanych czasopismach, stawiam wniosek do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.



prof. dr hab. Dariusz Bartosik