



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Mikrobiologii
Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiskowej



Warszawa, dnia 24.08.2020

Dr hab. Łukasz Drewniak, prof. ucz.

Tel. 5300917671

e-mail: ldrewniak@biol.uw.edu.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Angeliki Fiodor

pt. „Aktywność chitynolityczna a przynależność filogenetyczna wybranych przedstawicieli *Bacillus cereus sensu lato*”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Angeliki Fiodor została wykonana w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii pod kierunkiem prof. dr hab. Izabeli Świącickiej. Promotorem pomocniczym jest dr Justyna Małgorzata Drewnowska.

Tematyka pracy doktorskiej dotyczy analizy zjawiska chitynolityczności wśród przedstawicieli izolatów *Bacillus cereus sensu lato* pochodzących z różnych środowisk północno-wschodniej Polski. Poszerzanie wiedzy w zakresie mikrobiologicznej degradacji chityny jest niezwykle ważne z środowiskowego punktu widzenia, ze względu na fakt, że polimer ten jest jednym z najpowszechniej występujących w przyrodzie i jego dekompozycja istotnie wpływa na funkcjonowanie wielu ekosystemów. Ważnym aspektem jest także możliwość praktycznego zastosowania enzymów chitynolitycznych w przemyśle, w szczególności w rolnictwie w walce z grzybami pasożytniczymi. W przypadku badań nad przedstawicielami chitynolitycznych bakterii z grupy *B. cereus sensu lato* najwięcej informacji zostało opisanych dla szczepów *Bacillus thuringiensis*. Zasadne wydaje się więc zbadanie zjawiska chitynolityczności wśród pozostały laseczek należących do tej grupy.

Rozprawa doktorska mgr Angeliki Fiodor ma klasyczny, typowy dla rozpraw z dziedziny biologii układ. Główne rozdziały pracy obejmują streszczenie, wstęp, cele badawcze i hipotezy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie z wnioskami oraz bibliografię. Dodatkowo w pracy umieszczono wykaz skrótów i spis tabel oraz rycin.

W ramach wprowadzenia do tematu Doktorantka przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat zdolności chitynolitycznych bakterii, koncentrując się na budowie i właściwościach enzymów oraz ich praktycznym zastosowaniu. We wstępie pracy została także zaprezentowana grupa *B. cereus sensu lato*, zarówno pod kątem ogólnej charakterystyki fizjologicznej jak i filogenetycznej. Opisane zostały metody identyfikacji przedstawicieli tej grupy oraz wyróżnione dotychczas ekotypy. Wstęp pracy oceniam wysoko. Jest on przejrzysty, syntetyczny, odnosi się do najnowszej literatury i to co najważniejsze jest on adekwatny do celów pracy. Jedyne czego mi zabrakło, to graficznego przedstawienia prezentowanych informacji. Jedną z rycin mogłaby dotyczyć modularnej budowy enzymów chitynolitycznych i genów je kodujących. Taka forma prezentacji ułatwiłaby analizę omawianych informacji.

Cele pracy zostały poprawnie zdefiniowane i poprzedzone dodatkowym usadzeniem istoty podjęcia tematyki badań. Ponadto, w pracy zostały zaprezentowane dwie hipotezy badawcze wskazujące na kierunek prowadzonych badań.

Rozdział Materiały i Metody został napisany starannie, z uwzględnieniem wszystkich szczegółów pozwalających na zrozumienie i powtórzenie prowadzonych eksperymentów. Mam tylko jeden komentarz dotyczący tej części pracy. W związku z formą prezentowanej rozprawy doktorskiej (klasyczna monografia zamiast zbioru publikacji) brakuje oświadczeń dotyczących udziału współautorów uczestniczących w wykonywanych eksperymentach. Po przestudiowaniu opisów poszczególnych metod można wywnioskować, że Doktorantka wykonywała wszystkie eksperymenty od izolacji DNA, poprzez amplifikację, sekwencjonowanie i analizy filogenetyczne. Tymczasem, w publikacji Drewnowska i wsp. 2020 w *Systematic and Applied Microbiology* prezentującym wyniki niniejszej rozprawy doktorskiej, w rozdziale opisującym wkład autorów znajduje się informacja, że analizy filogenetyczne i genomowe zostały przypisane do innego autora. Wydaje mi się, że w takiej sytuacji zasadne byłoby uwzględnienie tej informacji w opisie metod.

W kolejnym rozdziale został przedstawiony szczegółowy opis uzyskanych przez Doktorantkę wyników. Dane zostały zaprezentowane w bardzo przejrzysty sposób w formie licznych tabel i rycin. Na specjalne wyróżnienie zasługuje szczegółowa analiza statystyczna

pozwalająca na dogłębne przedyskutowanie tematu zależności pomiędzy typem i wartościami aktywności chitynolitycznej, przynależnością do wyodrębnionych grup filogenetycznych oraz pochodzeniem (lokalizacją) szczepów. Wyróżnienie ekotypów chitynolitycznych bakterii *B. cereus sensu lato* jest jednym z ważniejszych osiągnięć w niniejszej pracy, ale wymaga doprecyzowania. Na Rycinie 3 (str. 50) zostało przedstawione drzewo filogenetyczne oraz informacje na temat występowania genów *chiA* i *chiB*, poziom ekspresji mRNA tych genów oraz aktywność enzymatyczna chitobiozydazy i endochitynazy. Czy w kontekście uzyskanych wyników nie należy zastanowić się nad wydzieleniem oddzielnego ekotypu lub podgrup w obrębie VI grupy filogenetycznej? Sekwencje genów *panC* szczepów niezdolnych do produkcji chitynaz ewidentnie grupują się razem i wydaje się, że mogą stanowić odrębny ekotyp.

Po przeczytaniu rozdziału Materiały i Metody i zapoznaniu się z podrozdziałem dotyczącym sekwencjonowania genomów z wykorzystaniem technik wysokoprzepustowych spodziewałem się szczegółowej analizy pod kątem badania determinantów genetycznych związanych z chitynolitycznością. Tymczasem, w Wynikach został przedstawiony szcątkowy opis analizy genomów wybranych izolatów oraz szczepów referencyjnych. Zastosowanie techniki wysokoprzepustowego sekwencjonowania w celu poznania genomu, nie powinno odnosić się tylko do identyfikacji genów kodujących białka zaangażowane w pobieranie cząsteczki N-acetylo-D-glukozaminy przez komórki oraz enzymów biorących udział w jej metabolizmie. Zastanawiam się dlaczego Doktorantka, mając dostęp do sekwencji całych genomów, nie przestudiowała całego kontekstu genowego związanego z chitynolitycznością. Warto odpowiedzieć na pytania: (1) jaka jest liczba kopii genów *chiA* i *chiB* w badanych genomach, (2) jakie geny towarzyszące współwystępują z genami *chiA* i *chiB*, (3) czy występują inne determinanty genetyczne powiązane z degradacją chityny np. *chiC* lub *chiD*?

Rozdział Dyskusja w sposób jasny i merytoryczny omawia uzyskane przez Autorkę wyniki i dyskutuje je w świetle wyników uzyskanych przez innych autorów. Bardzo ciekawym aspektem Dyskusji jest próba powiązania zależności opisujących zjawisko chitynolityczności oraz wyróżnionych ekotypów. W nawiązaniu do tego wątku chciałbym zadać dodatkowe pytania:

- 1) Co może być przyczyną tak dużego zróżnicowania poziomu aktywności chitynolitycznych szczepów, dla których stwierdzono możliwość rozkładu chityny koloidalnej i zidentyfikowano obecność obu genów *chiA* i *chiB*?

- 2) Dlaczego w ekotypie VI występowało najwięcej szczepów charakteryzujących się najwyższymi i najniższymi aktywnościami chitobiozydazy i endochitynazy? Czy to jest związane z liczebnością grupy czy może pochodzeniem szczepów i warunkami środowiskowymi ekosystemu?
- 3) Jak wytłumaczyć brak zależności pomiędzy typem i wartościami aktywności chitynolitycznej, przynależnością do grupy filogenetycznej oraz pochodzeniem szczepów? Jakie czynniki mogą wpływać na aktywność chitynolityczną tych szczepów?
- 4) Czym charakteryzuje się ekotyp niechitynolityczny? Czy można powiązać brak tej aktywności z warunkami środowiskowymi lub funkcją szczepów w strukturze całego zespołu mikroorganizmów z danego ekosystemu?

Merytoryczna część pracy doktorskiej kończy się rozdziałem Podsumowanie i wnioski. Doktorantka prezentuje w nim, w kompaktowej formie, najważniejsze osiągnięcia i wnioski płynące z przeprowadzonych eksperymentów.

Przedstawione w recenzji komentarze nie wpływają na moją pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej Pani Angeliki Fiodor. Przedstawiono w niej szereg interesujących, nowych i ważnych dla nauki obserwacji. Wszystkie zostały rzeczowo przedyskutowane w oparciu o bardzo dobrą znajomość danych literaturowych. Po zapoznaniu się z treścią rozprawy jestem w pełni przekonany, że Doktorantka jest dojrzałym naukowcem, zdolnym do planowania i prowadzenia eksperymentów, a także wnikliwej i prawidłowej interpretacji uzyskanych wyników.

Podsumowując uważam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w *art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789)*. Na tej podstawie składam wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu w Białymstoku o dopuszczenie mgr Angeliki Fiodor do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Łukasz Drewniak, prof. ucz.

