



Prof. dr hab. Małgorzata Brzezińska
Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego
Instytut Agrofizyki PAN w Lublinie

Lublin, 29.08.2018

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Weroniki Goraj

**pt. „Wytwarzanie ektoiny przez metanotrofy wyizolowane z otoczenia
pokładów soli w Wieliczce”**

Recenzję wykonano na prośbę prof. dr hab. Kazimierza Trębacza, Dziekana Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie (pismo z dnia 27.06.2018 r.).

Informacje o rozprawie

Rozprawa doktorska mgr Weroniki Goraj została wykonana w Katedrze Biochemii i Chemii Środowiska Katolickiego Uniwersytetu Jana Pawła II pod kierunkiem prof. dr hab. Zofii Stępniewskiej. Rozprawa obejmuje 223 strony formatu A4, łącznie ze spisem treści i bibliografią (547 pozycji), zawiera wykaz skrótów, 19 tabel, 53 rysunki, streszczenie w języku polskim i angielskim, oraz spis dorobku naukowego Doktorantki.

Wprowadzenie

Zjawisko metanotrofii znane jest już ponad 100 lat, jednak dopiero badania ostatnich 30-40 lat pozwoliły na lepsze zrozumienie biochemii i fizjologii metanotrofów. W świetle niedawnych odkryć należy też przypuszczać, że nie wszystko jeszcze zostało w pełni rozpoznane. Bakterie metanotroficzne są niezwykle pod wieloma względami. Wykazują duże zróżnicowanie, posiadają właściwości bioremediacyjne przekształcając w obecności metanu szereg niebezpiecznych związków organicznych, stosunkowo łatwo znoszą zanieczyszczenie środowiska metalami. Eliminują z powietrza metan, gaz cieplarniany znacznie silniejszy, niż ditlenek węgla. Wykorzystywane są, czasem po modyfikacji genetycznej, do przemysłowej produkcji białek, lipidów, związków organicznych i innych bio-produktów, a w określonych warunkach syntetyzują osmolity i biostabilizatory, m.in. ektoinę, z którą medycyna i przemysł wiążą obecnie duże nadzieje.

Merytoryczna ocena rozprawy

Tematyka przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej mgr Weroniki Goraj jest bezpośrednio związana z czołówką światowych badań łączących naukę i praktyczne zastosowanie nowoczesnych metod biotechnologicznych.

W rozdziale I. **WSTĘP** Doktorantka w sposób syntetyczny wprowadza czytelnika w temat pracy. Zwraca uwagę na możliwości wynikające z zastosowania wiedzy i nowoczesnych metod badawczych i podkreśla doświadczenie zespołu Katedry Biochemii i Chemii Środowiska KUL w badaniach nad biologiczną syntezą ektoiny. Celem pracy mgr W. Goraj była „izolacja i identyfikacja mikroorganizmów metanotroficznych towarzyszących pokładowi soli w Kopalni Soli „Wieliczka” oraz zbadanie zdolności wytwarzania ektoiny przez te mikroorganizmy”.

Doktorantka sformułowała cztery problemy badawcze:

- rozpoznanie bioróżnorodności mikroflory towarzyszącej pokładowi soli,
- wykazanie aktywności metanotroficznej materiału skalnego pobranego z otoczenia pokładów soli,
- izolacja i identyfikacja mikroorganizmów metanotroficznych,
- określenie biotechnologicznej syntezy osmoprotektantów, głównie ektoiny, przez te mikroorganizmy.

W mojej ocenie świadomość potrzeby oraz umiejętność wyznaczenia konkretnych etapów badań świadczy o samodzielności naukowej Doktorantki. Jak sama zaznacza, w niektórych aspektach badania te są pionierskie. Biorąc zaś pod uwagę zapotrzebowanie przemysłu farmaceutycznego i kosmetycznego oraz wartość rynkową ektoiny, testowanie bakterii metanotroficznych pod kątem możliwości ich zastosowania do produkcji ektoiny oceniane jest w literaturze naukowej jako obiecujące. Z tej perspektywy, biorąc też pod uwagę aspekt naukowy planowanych badań, pracę należy ocenić wysoko.

II. PRZEGLĄD LITERATURY (str. 11-59) przekonuje, że Doktorantka starannie przygotowywała się do tematyki podjętych badań. Rozdział zawiera informacje dotyczące zjawiska osmoadaptacji i właściwości osmolitów, a także ogólną charakterystykę bakterii metanotroficznych i informacje o ich potencjale biotechnologicznym.

Na stronie 46, linia 18 od góry: zdanie „Utlanie metanu przez metanotrofy zachodzi na dwóch drogach” jest źle sformułowane. Reakcje 1) i 2) to dwa sposoby zapisu procesu utleniania metanu.

Strona 47, pod Rys. 6: pomyłka w tekście: „*Monooksygenaza metanowa.. może występować w dwóch formach: rozpuszczalnej i błonowej. Pierwsza z nich pMMO...*”. Takie sformułowanie przypisuje skrót pMMO formie rozpuszczalnej enzymu, co nie jest prawdziwe. Podobna pomyłka jest w WYKAZIE SKRÓTÓW (str. 8): „*pMMO - rozpuszczalna monooksygenaza metanowa*”; Natomiast prawidłowa informacja jest w dalszej części tekstu (str. 145).

Strona 49, ostatni akapit: Wydaje się, że bardziej poprawny będzie zapis ...*Typ I metanotrofów charakteryzuje szlakiem RuMP asymilacji węgla... . Typ II cechuje się serynowym szlakiem asymilacji węgla pochodzącego z cząsteczki utlenianego metanu ...*

Strona 49, linia od góry 13: Proszę o wyjaśnienie skrótu WCB.

Strona 59, linia 1 od góry: ... *na poziomie 10 t w skali roku*.... – czy jest to szacunek odnoszący się do światowej produkcji kobalaminy?

Rozdział **III. MATERIAŁY I METODY**. Badania zostały przeprowadzone na materiale skalnym W1, W2, W3, W4, scharakteryzowanym pod względem litograficznym przez specjalistę, Głównego Geologa Kopalni (str. 61-62).

W rozdziale 3. Metodyka badań, Autorka napisała, że zakres prac obejmował: izolację i identyfikację mikroorganizmów metanotroficznych (etap I), oraz określenie zdolności syntezy ektoiny przez wyizolowane mikroorganizmy (etap II). Brzmi prosto, jednak lektura pracy przekonuje, że realizacja zamierzonych celów wymagała wiedzy, umiejętności i wiele czasu.

Schemat przedstawiony na Rys. 11 (str. 63) zawiera ważne informacje dotyczące inkubacji realizowanych w I etapie badań – definiuje warunki oznaczenia aktywności metanotroficznej materiału skalnego oraz wstępnych inkubacji. Biorąc pod uwagę rozbudowany układ przeprowadzonych doświadczeń wydaje się, że – z punktu widzenia czytelnika – brakuje tu równie syntetycznego przedstawienia warunków ustalonych dla dalszych etapów badań (prezentowanych w podrozdziałach 3.6 - 3.7) w taki sposób, by podana informacja była spójna z późniejszym opisem *etapów* przy omawianiu wyników badań (w podrozdziałach 5.3 i 5.4).

Na stronie 67 (Podrozdział 3.4) podana jest informacja: „*W celu optymalizacji warunków utleniania metanu przez potencjalne mikroorganizmy metanotroficzne ... wykonano inkubacje w różnych warunkach uwilgotnienia, temperatury, stężenia CH₄ (Tab.5)*”. Wymieniona Tab. 5 (str. 68) oraz wcześniejszy schemat na Rys. 11 (str. 63) wskazują dla wstępnych inkubacji zakres temperatury 10-20°C. Dlaczego dalsze hodowle metanotrofów prowadzone były w wyższej temperaturze, 30°C (rys. 11 oraz str. 69)? Brakuje też wyjaśnienia przyczyny zmian zakresu stężeń NaCl z 0-10% (str. 63, Rys. 11) do 0-25% (str. 69); Zdolność do biosyntezy osmoprotektantów określano przy 1 lub 2% NaCl (str. 75), zaś stres osmotyczny wywoływano stosując stężenie 1-5% NaCl (str. 77).

Strona 67, linia 7 od góry: Czy rzeczywiście jako standard do oznaczeń węgla nieorganicznego zastosowano glukozę?

Rozdział **IV. WYNIKI**. W tym rozdziale Autorka konsekwentnie opisuje poszczególne etapy przeprowadzonych badań. Spośród pobranych materiałów skalnych, najbardziej aktywna metanotroficznie była „*skała W4, pobrana z otoczenia złóż soli zielonych pokładowych z głębokości około 130 m p.p.t.*” (str. 94). Ten materiał skalny został wybranych do dalszych badań.

Tab. 12, str. 86: Zawartość związków biogennych powinna zostać przeliczona na suchą masę materiału skalnego.

Podpis pod Rys. 23 (str. 96) zawiera odniesienie do prób *izolat I-1; II-2; 0-1*, których znaczenie powinno być w tym miejscu przypomniane.

Rozdział 5 (str. 97-122) dostarcza nowych, cennych informacji o składzie populacji bakterii w aktywnym materiale skalnym, a następnie o aktywności metanotrofów na poszczególnych etapach dalszych badań.

Strona 106: Proszę o sprawdzenie, czy Rys. 26. rzeczywiście przedstawia opisywane zamiany stężenia gazów? Wydaje się, że stężenie CH_4 w ostatnim dniu inkubacji było niewiele niższe od 10%. Również stężenie CO_2 na rysunku nie wydaje się być wyższe od 3-4%. Końcowe stężenia obu gazów nie są chyba do zbliżone do 5,5%, jak sugeruje opis.

W tym miejscu proszę też o informację, w jakim celu na wykresach przedstawione zostały zmiany stężenia azotu, N_2 ? Rezygnacja z pokazania zmian stężenia azotu znacznie zwiększyłaby czytelność wykresów. Czy według Pani wzrost stężenia N_2 badanych próbkach – na niektórych wykresach bardzo wyraźny – jest w wyniku procesu biologicznego? Jeśli tak, to jakiego? Zgodnie z danymi dostępnymi w literaturze naukowej, niektóre tlenowe metanotrofy mogą w warunkach hipoksji redukować azotany(V) i (III), lecz nie posiadają one enzymów potrzebnych do przeprowadzenia pełnej denitryfikacji (do N_2). Bardziej prawdopodobne byłoby wydzielanie N_2O , pośredniego produktu denitryfikacji; rzeczywiście, są takie doniesienia. Zatem, czy wzrost stężenia N_2 nie jest wynikiem obliczeń programu kalkulacyjnego Shimadzu, który ‘sumuje’ analizowane gazy do 100%?

Strona 134: Proszę o sprawdzenie zgodności danych przedstawionych na Rys. 47 z opisem pod rysunkiem (górny wykres: maksimum na skali $0,10 \text{ mg g}_{\text{s.m.}}^{-1}$, a w opisie: $0,317 \text{ mg g}_{\text{s.m.}}^{-1}$; Dolny wykres: *izolat 0-2* (informacja na wykresie), czy *izolat I-2* (informacja w opisie poniżej); również tutaj wyraźna jest niezgodność wartości na wykresie z opisem).

Rozdział V zawiera szeroką i ciekawą **DYSKUJĘ**, która systematyzuje i uzupełnia wyniki dotyczące mikroflory zidentyfikowanej w materiale skalnym oraz syntezy ektoiny i hydroksyektoiny przez aktywne mikroorganizmy metanotroficznie. Autorka świadoma jest wartości przeprowadzonych badań, ale także konieczności dalszego, pełniejszego rozpoznania podjętej problematyki.

Strona 145, linia 5 od góry: niezręcznie napisane - potencjał redoks nie może być wykorzystywany jako akceptor elektronów.

Strona 165, linia 5 od góry: Co oznacza „*poboczny szlak utleniania CH_4* ”?

Rozdział VI. **WNIOSKI** sformułowane przez Autorkę (czternaście pozycji) w czytelny sposób odnoszą się do postawionych problemów badawczych.

Opracowanie badań, szczególnie tak szerokich jak te prezentowane w pracy mgr W. Goraj, wymaga przekazania wielu informacji i to w taki sposób, żeby tekst był zrozumiały również dla osób, które nie uczestniczyły w planowaniu i realizacji badań. Dlatego zalecania wysoko indeksowanych czasopism naukowych – by nagłówki tabel oraz podpisy pod rysunki były napisane w przejrzysty sposób, bez potrzeby szukania informacji w tekście – wydają się

uzasadnione. Bardzo dobrym pomysłem, który zastosowała Doktorantka, jest podawanie krótkich, graficznie wyodrębnionych 'podsumowań' przy zakończeniu poszczególnych rozdziałów opisujących otrzymane wyniki. Na pewno badania pozwalające na sformułowanie merytorycznie cennych wniosków dały Doktorantce dużo satysfakcji.

Uwagi szczegółowe odnoszące się do drobnych pomyłek w tekście:

- strona 41, linia 4 ostatniego akapitu: Rys. 4?
- strona 45, linia 6 od dołu: ...białek chelatujących...
- strona 81, linia 4 od dołu: $p < 0,05$

Proszę o odpowiedź na dodatkowe pytanie:

- Czy rozważała Pani możliwość przeprowadzenia badań z wykorzystaniem izotopu $^{13}\text{C}-\text{CH}_4$? Takie doświadczenie pozwoliłoby jednoznacznie określić, czy i w jakim stopniu konsumowany metan jest przekształcany w ektoinę. Czy takie badania były już publikowane?

Podsumowanie

Praca doktorska mgr Weroniki Goraj stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego z elementami nowatorskimi włącznie. Realizacja zamierzonego celu wymagała zaprojektowania doświadczenia oraz wypracowania i optymalizacji warunków na poszczególnych etapach eksperymentu. Badania wykonano z wykorzystaniem nowoczesnych metod. Dyskusja została przeprowadzona merytorycznie, a wnioski sformułowane w czytelny sposób. W mojej ocenie przedstawiona praca doktorska charakteryzuje się wysokim poziomem merytorycznym, potwierdzając szeroką wiedzę Doktorantki oraz umiejętności konieczne do prowadzenia badań naukowych w prezentowanej dziedzinie naukowej.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Weroniki Goraj pt. „Wytwarzanie ektoiny przez metanotrofy wyizolowane z otoczenia pokładów soli w Wieliczce” spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. nr 65, poz. 595) z późniejszymi zmianami. W związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS w Lublinie o dopuszczenie mgr Weroniki Goraj do dalszych etapów przewodu doktorskiego, jednocześnie wnoszę o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.



prof. dr hab. Małgorzata Brzezińska