



Katowice, 05.04.2019 r

Prof. dr hab. Zofia Piotrowska-Seget  
Katedra Mikrobiologii  
40-032 Katowice  
ul. Jagiellońska 28

#### RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Aleksandry Dubickiej-Lisowskiej pt: „Charakterystyka enzymatycznych i nieenzymatycznych mechanizmów bioremediacji chromianu u wybranych drobnoustrojów pro- i eukariotycznych oraz makrofitów”  
wykonanej w Zakładzie Biochemii, Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie  
pod kierunkiem dr hab. Pawła Kaszyckiego

#### **Przedmiot rozprawy**

Przedstawiona do recenzji praca dotyczy interakcji pomiędzy wybranymi bakteriami, grzybami i makrofitami, a metalem ciężkim - chromem (Cr). Wskutek działalności człowieka wiele środowisk zanieczyszczonych jest związkami tego metalu, a jego toksyczny wpływ możemy obserwować na poziomie komórki, organizmu i ekosystemu. Wysoka toksyczność Cr, szczególnie chromu na szóstym stopniu utlenienia sprawia, że konieczne jest podejmowanie działań, których efektem będzie oczyszczenie skażonych środowisk. Remediację takich terenów przeprowadzać można z wykorzystaniem fizycznych i chemicznych technik, które są jednak drogie i często wiążą się z użyciem związków chemicznych nieobojętnych dla organizmów żywych. Alternatywą tych technik może być bioremediacja, która wykorzystuje potencjał mikroorganizmów i roślin do usuwania lub immobilizacji metali ciężkich obecnych w środowisku. Bioremediacja opiera się na aktywności organizmów, które są odporne/odporne na wysokie stężenia metali i zdolne są do akumulacji lub biosorpcji znacznych ich ilości. Niezwykle ważnym jest również identyfikacja mechanizmów oporności/odporności organizmów na metale ciężkie.

Przedstawione w ocenianej rozprawie doktorskiej badania wpisują się w światowy trend poszukiwania i/lub ulepszania biologicznych metod oczyszczania środowisk zanieczyszczonych metalami ciężkimi. Jest to jeden z najważniejszych nurtów biotechnologii środowiskowej, dlatego też podjęcie tej tematyki badawczej uważam za bardzo zasadne.

#### **Ocena formalna pracy**

Przedłożona do oceny rozprawa ma układ typowy dla doktorskich prac eksperymentalnych. Obejmuje 214 stron maszynopisu i zawiera 7 podstawowych rozdziałów: Przegląd literatury, Cel pracy i hipotezy badawcze, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i wnioski i Spis literatury. Pracę uzupełnia wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz Dodatek –



rozdział, w którym podano skład podłoży i odczynników stosowanych w analizach. Praca została przygotowana starannie pod względem językowym i edytorskim.

Rozprawę zaczyna 19 stronicowy, Przegląd literatury, który w sposób uporządkowany i przejrzysty wprowadza czytelnika w tematykę badań przedstawionych w rozprawie. Kolejny, bardzo obszerny, rozdział to Materiały i metody, który został podzielony na 43 podrozdziały. Wyniki przedstawiono na 86 stronach pracy i zebrano, w postaci czytelnych i przejrzystych, 5 tabel i aż 111 rycin. Uzyskane wyniki zostały przedyskutowane i skonfrontowane z wynikami innych badaczy w 31 stronicowej Dyskusji. Rozprawę kończy podsumowanie i wnioski, które w syntetyczny sposób ujmują najważniejsze osiągnięcia rozprawy.

## Ocena merytoryczna

### *Przegląd literatury*

Rozdział ten, podzielony na 7 głównych podrozdziałów, Autorka zaczyna od charakterystyki chromu, jego przemysłowego wykorzystania oraz problemu zanieczyszczeniu środowiska przez ten metal ciężki. W dalszych częściach przeglądu Doktorantka skupia swoją uwagę na toksyczności różnych form chromu wobec organizmów żywych. Porównała toksyczność chromu Cr(VI) i Cr(III) oraz przedstawiła mechanizmy ich szkodliwego działania na komórki. Wyczerpująco i dokładnie przedstawiła mechanizmy oporności na jony chromu bakterii, grzybów i roślin. Wiele uwagi Doktorantka poświęciła mechanizmom biologicznej redukcji Cr(VI). Przedstawiła molekularne podstawy tych procesów oraz enzymy w nich zaangażowane. W teoretycznym przeglądzie omówiła również eksperymentalne modele badawcze wykorzystywane do oceny wpływu związków chromu na organizmy pro- i eukariotyczne.

W mojej ocenie zaprezentowany przegląd literatury stanowi logiczną i spójną całość. Został napisany przejrzysto i zawiera wszystkie informacje niezbędne do interpretacji uzyskanych wyników.

### *Cele rozprawy*

Przedstawione teoretyczne podstawy oddziaływań chrom – mikroorganizmy oraz chrom – rośliny są dobrym wprowadzeniem do celów pracy, którymi było: (1) ocena wpływu Cr(VI) na tempo wzrostu i biomasy bakterii; (2) określenie poziomu akumulacji chromu w komórkach wybranych bakterii; (3) ocena zdolności badanych organizmów do redukcji Cr(VI) oraz (4) charakterystyka proteomu mikroorganizmów i makrofitów poddanych działaniu subletalnych stężeń chromianu.

Warto podkreślić, że przed Panią mgr inż. Aleksandrą Dubicką-Lisowską stały również wyzwania metodyczne. Przeprowadzenie analizy proteomów badanych organizmów wymagało zmodyfikowania metod elektroforetycznych (PAGE, 2De, SDS PAGE) oraz zymografii, co samo w sobie stanowiło niełatwe i pracochłonne wyzwanie badawcze.

### *Materiały i metody*

Wszystkie metody i procedury potrzebne do realizacji postawionych celów badawczych zostały w mojej ocenie opisane prawidłowo i w sposób umożliwiający ich powtórzenie.



Materiał do badań stanowiły trzy szczepy *Pseudomonas alcaligenes* (oznaczone numerami 12, 31 i 37), dwa szczepy *Pseudomonas* sp. (oznaczone numerami 18 i 19) oraz szczep *Burkholderia cepacia* 33 wyizolowane z gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi i zdeponowane w kolekcji Zakładu Biochemii Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa UR oraz *Bacillus cereus* ZB001. Prosiłabym o informację z jakiego środowiska ten ostatni szczep został izolowany – w rozprawie podano tylko, że szczep ten został pozyskany z próbek testowanych podczas badań nad oddziaływaniem chromu na organizmy żywe. Czy został wyizolowany z któregoś z badanych makrofitów? Uważam również, że szczep *Bacillus cereus* ZB001-2, który Autorka wyselekcjonowała w trakcie badań i wykorzystywała w doświadczeniach powinien być w materiałach wymieniony.

Pośród eukariotycznych mikroorganizmów w badaniach wykorzystano drożdże *Pichia guilliermondii* szczep L2 oraz trzy jego mutanty: *hit*, *rib80* i *rib81* pochodzące z kolekcji mikroorganizmów Ukraińskiej Akademii Nauk. Natomiast jako model roślinny wybrano cztery gatunki makrofitów: rzęśl długoszyjkową (*Callitriche cophocarpa* Sendtn.), spirotele wielokorzeniową (*Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid.), moczarkę kanadyjską (*Elodea canadensis* Mich) oraz rzęsę trójrowkową (*Lemna trisulca* L.). Makrofity te pochodziły z Zakładu Botaniki i Fizjologii Roślin WBiO (*Callitriche cophocarpa*), Ogrodu Botanicznego UJ (*Elodea canadensis*) oraz z Zakładu Fizjologii i Biochemii Roślin Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ (*Lemna trisulca*, *Spirodela polyrhiza*). Mam drobną uwagę do tej części rozdziału „Materiały i metody” (str. 41) – przedstawianie literaturowych informacji na temat mechanizmów usuwania chromu z wody przez te makrofity jest w tym miejscu niepotrzebne. Takie dane zamieszcza się w Przeglądzie literatury bądź Dyskusji.

Obok tradycyjnych metod stosowanych do hodowli mikroorganizmów, obliczania ich liczebności i biomasy w podłożach, oznaczanie ilości zakumulowanego chromu, wyznaczenia minimalnego stężenia Cr hamującego (MIC) wzrost mikroorganizmów Doktorantka wykorzystywała zaawansowane metody analityczne - atomową spektrometrię emisyjną ze wzbudzeniem w plazmie indukowanej oraz spektrometrię elektronowego rezonansu paramagnetycznego. Zastosowanie tych technik spektrometrii umożliwiło Doktorantce uzyskanie dokładnych i wiarygodnych wyników zawartości chromu w biomacie, a także – co uważam za bardzo ważne – monitorowanie *in vivo* procesów redukcji chromu Cr(VI) do Cr(III). Do oceny reakcji badanych organizmów na stres wywołany obecnością Cr w środowisku mgr inż. Aleksandra Dubicka-Lisowska oznaczała również aktywność reduktazy chromianowej oraz – co oceniam bardzo wysoko - przeprowadziła analizy profili ekstraktów białkowych *Bacillus cereus* ZB001. W celu sprawdzenia obecności na żelach elektroforetycznych bakteryjnych i roślinnych enzymów potencjalnie zaangażowanych w redukcję Cr(VI) doktorantka zastosowała zymografię reduktaz chinonowych.

W badaniach nad wpływem chromu na makrofity Doktorantka oceniała aktywność enzymów antyoksydacyjnych: katalazy, peroksydaz rozpuszczalnych i dysmutazy ponadlitenkowej w oparciu o powszechnie stosowane metody. W przypadku rzęśli oceniano proteomy roślin poddanych działaniu chromu i roślin kontrolnych. Dodatkowo, aby ocenić czy obserwowane zmiany w proteomie rzęśli wynikają z reakcji roślin na chrom, badano proteom tego makrofitu poddanego działaniu innych stresów solnego, parakwatu i nadtlenu wodoru.



Biorąc pod uwagę różnorodność i bardzo duży zakres badań niezwykle wysoko oceniam wysiłek Doktorantki włożony w realizację zaplanowanych doświadczeń.

### **Wyniki**

Rozdział ten został podzielony na trzy logiczne części, w których kolejno przedstawiono wpływ Cr(VI) na bakterie, grzyby i makrofity. Pierwsza, najbardziej obszerna, część wyników przedstawia wpływ jonów chromu na przeżywalność, tempo wzrostu i biomasę poszczególnych szczepów bakterii oraz ich zdolność do akumulacji Cr. Mam w tym miejscu uwagę do zaprezentowanych w pracy wykresów. Na wykresach przedstawiających np.: przeżywalność czy biomasę bakterii powinno być zaznaczone czy obserwowane różnice są statystycznie istotne. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że badane szczepy bakterii znacznie różnią się wrażliwością na jony chromu. Najbardziej tolerancyjne okazały się być szczepy *P. alcaligenes* 31 i *B. cereus* ZB001, które tolerowały stężenia chromianu odpowiednio 35 mM i aż 100 mM. Co istotne, reakcja bakterii na Cr (VI) uzależniona była od fazy ich wzrostu i związanej z nią liczebnością badanych bakterii. Wysoka tolerancja szczepu *B. cereus* ZB001 skłoniła Doktorantkę do selekcji komórek bakterii, które zaadaptowały się do bardzo wysokich stężeń chromu (120 mM). Wyselekcjonowany klon oznaczony jako *B. cereus* ZB001-2 był wykorzystywany w kolejnych doświadczeniach. Analizy przeprowadzone na podłożach z wzrastającym stężeniem chromu wykazały, że tolerancja szczepu *B. cereus* ZB001-2 była wyższa niż formy wyjściowej. W kolejnej części rozdziału przedstawiono zdolność bakterii do akumulacji chromu. Zdolność ta była bardzo zróżnicowana, a ilość związanego przez komórki Cr wahała się w granicach 1,41 - 16,9 mg g<sup>-1</sup> suchej masy bakterii. Wykazano ponadto, że ilość zakumulowanego Cr istotnie zależała od stężenia jonów Cr w podłożu hodowlanym i fazy wzrostu populacji, w której wprowadzono Cr do podłoża. Najwyższą, podaną wyżej, ilość związanego Cr obserwowano u szczepu *B. cepacia* 33 hodowanego przez 48 godz. na podłożu zawierającym 5 mM Cr(VI).

Ocena zdolności badanych szczepów bakterii do redukcji Cr (VI) do Cr(III), jako potencjalnego mechanizmu oporności bakterii na Cr, wykazała, że tylko dwa szczepy *B. cereus* ZB001 i *P. alcaligenes* 31 mogą katalizować tę reakcję. Potwierdzeniem zdolności tych szczepów do redukcji Cr(VI) było wykazanie w ich ekstraktach komórkowych aktywności NADH-zależnej reduktazy chromianowej. Doktorantka ponadto wykazała, że aktywności tych enzymów uzależnione są od temperatury inkubacji i obecności kofaktorów NADH i NAD(P)H.

W pracy analizowano również profile białek uzyskanych z komórek bakterii poddanych działaniu Cr(VI). Badania te wykazały, że w porównaniu do kontroli – bakterii hodowanych w podłożu bez Cr – profile były różne, co ewidentnie świadczy o wpływie jonów Cr na ekspresję określonych genów i w konsekwencji obecności lub braku pewnych białek w proteomie. Przeprowadzono również analizę zymograficzną, która miała na celu wykazanie obecności reduktazy chinonowej. Nie udało się jednak przypisać prążków odpowiadających reduktazie chinonowej do profilu białek na żelu po barwieniu kumazyną.

W badaniach wpływu chromianu na drożdże autorka skupiła uwagę na ich zdolnościach do redukcji chromianu. Pomiar kinetyki redukcji Cr (VI) prowadzono w hodowli drożdży, odwirowanych komórkach zawieszonych w soli fizjologicznej i płynie pohodowlanym. Doświadczenia



przeprowadzone z zastosowaniem techniki *L-band* EPR pokazały, że szczep *P. guilliermondii* L2 i jego mutanty *P. guilliermondii rib80*, *P. guilliermondii rib81* i *P. guilliermondii hit* zdolne do nadsyntezy ryboflawiny, redukują Cr(VI). Doktorantka wykazała także, że egzogenna ryboflawina jest czynnikiem sprzyjającym redukcji Cr(VI) i tym samym moduluje oporność badanych drożdży na chrom.

Do najważniejszych wyników dotyczących interakcji makrofitów z Cr(VI) zaliczam wykazanie, dzięki zastosowaniu elektroforezy 2D, że subletalne stężenia Cr(VI) indukują zmiany w proteomie badanych roślin oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy nadtlencowej, katalazy i peroksydazy. Trudno jednak uogólnić reakcję makrofitów na Cr(VI), gdyż obserwowane zmiany były zróżnicowane i uwarunkowane gatunkiem makrofitu.

Chciałabym podkreślić, że wyniki dotyczące odpowiedzi *Callitriche cophoracpa* na jony Cr(VI) na poziomie proteomu i aktywności enzymów antyoksydacyjnych zostały opublikowane w bardzo dobrym czasopiśmie z listy JCR *Environmental Science and Pollution Research* (co jest najlepszą recenzją uzyskanych wyników). Doktorantka jednoznacznie udowodniła, że pojawienie się dehydrogenazy chinonowej zależnej od NADP(H) w elektroforetycznym profilu białek było wynikiem stresu oksydacyjnego wywołanego ekspozycją rzęśli na Cr(VI). Enzym ten bowiem nie pojawił się w profilu białek u roślin poddanych działaniu parakwatu, stresu solnego i nadtlenu wodoru, czynników również wywołujących stres oksydacyjny.

W mojej ocenie pozostałe wyniki zaprezentowane w rozprawie również powinny zostać opublikowane w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania (IF).

### Dyskusja

W rozdziale tym Pani mgr inż. Aleksandra Dubicka-Lisowska przeprowadziła dyskusję uzyskanych wyników zgodnie z postawionymi celami badawczymi. Dyskusja jest także rzeczowym omówieniem wyników i w każdym punkcie jest odniesiona do wyników - często odmiennych - opublikowanych przez innych badaczy. Lektura tego rozdziału przekonuje mnie, że Doktorantka jest w pełni dojrzałym badaczem. Rozdział ten pokazuje ponadto, że Autorka ma szeroką wiedzę i swobodnie porusza się w światowej literaturze dotyczącej oddziaływań jonów chromu z mikroorganizmami i roślinami. W mojej ocenie mgr inż. Aleksandra Dubicka-Lisowska jest zdolna nie tylko do przeprowadzenia wielu eksperymentów, ale również do właściwej interpretacji uzyskanych wyników.

Pracę kończą wnioski, które znajdują odzwierciedlenie w uzyskanych rezultatach. Wnioski są poprawne i pokazują zdolność Doktorantki do syntetycznego ujęcia uzyskanych wyników.

W Podsumowaniu Doktorantka wskazała, które z badanych organizmów mają największy potencjał do bioremediacji środowisk zanieczyszczonych związkami chromu. Wśród nich jest szczep drożdży *Pichia guilliermondii rib81*, wykazujący zdolność do redukcji Cr(VI). Chciałabym się zapytać, czy nie warto było zbadać, jaki potencjał do wiązania Cr mają komórki tych drożdży? Wprawdzie w Przeglądzie literatury Autorka podała informację, że grzyby z rodzaju *Pichia* zdolne są do akumulowania Cr, jednak różnice w ilości związanego Cr pomiędzy gatunkami i szczepami są duże.

Doktorantka zebrała bardzo bogate piśmiennictwo. W spisie tym znajdują się wszystkie ważne publikacje dotyczące zakresu badań Doktorantki, które ukazały się w ciągu ostatnich kilku lat. Zebraną literaturę umiejętnie wykorzystywała. Mam drobną uwagę do sposobu edycji literatury.



Uważam, że w wykazie literatury angielskojęzycznej nie powinno się stosować polskich skrótów: t (tom), ss (strony).

Przedstawiona rozprawa pod względem edytorskim przygotowana jest starannie. Napisana jest poprawnym językiem i w przejrzysty sposób. Doktorantka nie uniknęła jednak nielicznych błędów literowych i stylistycznych oraz niedokładności, które jednak nie przeszkadzają w zrozumieniu tekstu i nie wpływają na ocenę merytoryczną rozprawy.

Wymienię kilka uwag:

1. Potencjał akumulacji Cr był różny ..... i zawierał się w przedziale 1,2-10 mg g<sup>-1</sup> s.m (str. 26) – potencjału do akumulacji nie wyrażamy w mg g<sup>-1</sup> s.m, powinno być ilość zakumulowanego chromu mieściła się w przedziale .....
2. ...zliczono wyroste kolonie w celu wyznaczenia parametru jtk ml<sup>-1</sup> (str. 50) - powinno być: .... w celu obliczenia liczebności jtk ml<sup>-1</sup>
3. Artefakty badawcze – powinno być: artefakty
4. Analiza zmian ekspresji poszczególnych plamek białkowych (ryc. V.82) – plamki nie mogą podlegać ekspresji

#### Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa pt.: „Charakterystyka enzymatycznych i nieenzymatycznych mechanizmów bioremediacji chromianu u wybranych drobnoustrojów pro- i eukariotycznych oraz makrofitów” wykonana przez Panią mgr Aleksandrę Dubicką-Lisowską stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i w pełni spełnia warunki wymagane dla prac doktorskich zawarte w Ustawie o Stopniach i Tytułach Naukowych z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami. Doktorantka udowodniła, że potrafi rozwiązywać problemy metodyczne i posiada teoretyczną wiedzę w zakresie mikrobiologii i biotechnologii środowiska. Pokazała, że postępuje się szerokim wachlarzem metod badawczych oraz ma umiejętność prezentowania, interpretacji i dyskusji wyników. W związku z tym mam zaszczyt przedstawić Radzie Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie wniosek o dopuszczenie mgr inż. Aleksandrę Dubicką-Lisowską do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*2.12.2017*