



Instytut Botaniki im. W. Szafera
Polskiej Akademii Nauk
ul. Lubicz 46, 31-512 Kraków
tel. 12 421-51-44; fax 12 421-97-90
WWW: <http://www.botany.pl> [tam również adresy e-mail]

Prof. dr hab. Barbara Godzik

Kraków, 2019.04.09.

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr inż. **Aleksandry Dubickiej-Lisowskiej** pt. „Charakterystyka enzymatycznych i nieenzymatycznych mechanizmów bioremediacji chromianu u wybranych drobnoustrojów pro- i eukariotycznych oraz makrofitów”

Promotor: dr hab. Paweł Kaszycki

Po ponad 150 letnim okresie rozwoju przemysłu w środowisku znalazło się wiele pierwiastków i ich związków, które niekorzystnie wpływają na ekosystemy i poszczególne organizmy. Niektóre z nich nie wypracowały mechanizmów umożliwiających życie w warunkach obciążenia środowiska zanieczyszczeniami i musiały z niego ustąpić, inne dostosowały się wytwarzając różne mechanizmy oporności, np. akumulacji metali i unieruchamiania ich w ścianach komórkowych (gdzie nie wpływają na procesy metaboliczne), unikania pobierania, czy też, jak w przypadku chromu występującego na różnych stopniach utlenienia, bioredukcji do form charakteryzujących się relatywnie niską toksycznością. Doktorantka zajęła się wyjaśnianiem strategii obronnych wybranych organizmów przed stresem oksydacyjnym spowodowanym obecnością chromu w środowisku. Poznanie mechanizmów adaptacji organizmów do warunków środowiskowych pozostaje stale w centrum uwagi naukowców, którzy na różnych poziomach (ekologicznym, fizjologicznym, morfologicznym) próbują opisać te cechy organizmów, które pozwalają im przeżyć w zmieniających się i często trudnych warunkach. Efektem wzrostu poziomu metali czy innych pierwiastków w środowisku są m.in. zmiany składu chemicznego i proporcji pierwiastków w organizmach żywych. Wyjaśnienie procesów fizjologicznych umożliwiających życie w warunkach skażenia środowiska jest też warunkiem opracowania, czy udoskonalania metod bioremediacji środowiska.

Rozprawa doktorska Pani A. Dubickiej-Lisowskiej powstała pod kierunkiem dr hab. Pawła Kaszyckiego w Instytucie Biologii Roślin i Biotechnologii Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, w którym od lat prowadzi m.in. badania nad wykorzystaniem organizmów żywych do bioremediacji

zanieczyszczeń i wyjaśnienia procesów fizjologicznych będących podstawą zrozumienia mechanizmów oczyszczania środowiska ze szkodliwych związków.

Zgodnie z ustawą rozprawa doktorska może mieć różną formę, tj. maszynopisu monografii, książki wydanej lub spójnego tematycznie zbioru rozdziałów w książkach wydanych, spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach naukowych. Rozprawa doktorska mgr inż. A. Dubickiej-Lisowskiej spełnia ten pierwszy warunek. Jej praca stanowi więc w 100% własne, samodzielne osiągnięcie. W początkowej części pracy autorka zamieściła informację, iż część wyników eksperymentalnych została już opublikowana, w tym w pierwszej publikacji z roku 2018 jest współautorką (publikacja w wysokoimpaktowym czasopiśmie z bazy ICR), a drugiej jest jedynym autorem. Zaplanowano również publikacje dwóch kolejnych artykułów, co pozwala mieć nadzieję graniczącą z pewnością, że najbardziej wartościowe wyniki zostaną upowszechnione, a więc badania te nie zostały wykonane tylko dla potrzeb uzyskania stopnia.

Doktorantka postawiła 3 główne cele badań oraz 4 cele metodyczne. Są one sformułowane przejrzysto. Celami podstawowymi było (1) scharakteryzowanie wybranych enzymatycznych i nieenzymatycznych reakcji prowadzących do redukcji Cr(VI) do Cr(III) w komórkach badanych organizmów, czyli reakcji prowadzących do zmniejszenia toksyczności chromu, (2) opisanie na poziomie zmian w proteomie reakcji wywołanych stresem oksydacyjnym, spowodowanym obecnością chromu w komórce i (3) wyodrębnienie i zaproponowanie organizmów o najkorzystniejszych strategiach eliminacji czy obniżenia toksyczności chromu, które to cechy są przydatne w bioremediacji. Celami metodycznymi było m.in. opracowanie czy udoskonalenie metod elektroforetycznych analiz proteomów, detekcji aktywności enzymów zaangażowanych w odpowiedzi na stres spowodowany chromem. Postawiono następujące 3 hipotezy badawcze: (1) chrom oddziałuje na komórki organizmów żywych powodując zmiany w proteomie oraz zmiany w syntezie enzymów i/lub zwiększoną produkcję czynników nieenzymatycznych, (2) organizmy należące do różnych grup systematycznych reagują w różny sposób na stres spowodowany chromem. Trzecia z hipotez jest właściwie stwierdzeniem, iż organizmy charakteryzujące się mechanizmami tolerancji na chrom mogą być wykorzystywane w bioremediacji.

W odróżnieniu od związków organicznych, które ulegają degradacji, chrom podlega akumulacji w wodzie i osadach dennych oraz w glebie i wpływa niekorzystnie na bytujące tam organizmy. Z tego względu, jak też mając na uwadze różne możliwe strategie radzenia sobie ze stresem spowodowanym obecnością chromu, Doktorantka do badań wytypowała kilka obiektów-organizmów z różnych grup systematycznych. Były to wybrane szczepy bakterii należących do 3 rodzajów: *Pseudomonas*, *Burkholderia* i *Bacillus*. Drugą grupę stanowiły 4 szczepy drożdży z gatunku

Pichia guilliermondii, a trzecią wybrane 4 gatunki makrofitów: *Elodea canadensis*, *Callitriche cophocarpa*, *Spirodela polyrhiza* i *Lemna trisulca*. Zastosowano bardzo szeroki wachlarz metod analitycznych i testów, dzięki którym weryfikowano postawione hipotezy.

W związku z tak rozbudowanymi zagadnieniami podlegającymi badaniu, jak też wykorzystaniu w badaniach eksperymentalnych kilku modeli badawczych, rozprawa doktorska jest bardzo obszerna. Liczy łącznie 214 stron tekstu, do którego włączono tabele i ryciny, co usprawnia poruszanie się po tekście i podążanie za interpretacją wyników. Przyjęty klasyczny układ rozprawy i konsekwentne opisy wyników, pomimo znaczącej objętości pracy powodują, że czytelnik jest w stanie podążać za myślą autorki. Praca składa się z 6. podstawowych rozdziałów, z których poza częściami II *Cele i hipotezy badawcze* i III *Modele badawcze*, pozostałe zawierają rozbudowane podrozdziały. W 34. stronicowym *Wstępie* Doktorantka opiera się na cytowaniu licznych danych z literatury dotyczących charakterystyki chromu i jego toksyczności, jak też przytacza wyniki badań nad mechanizmami oporności i radzenia sobie ze stresem spowodowanym obecnością metali w środowisku, w którym żyją organizmy. Rozdział IV *Materiał i metody* jest rzetelnym i wyczerpującym opisem zastosowanych dla zrealizowania badań metod. Dobór metod analitycznych jest trafny.

Najobszerniejszą częścią rozprawy jest rozdział *Wyniki*, który liczy 85 stron. W ramach pierwszego modelu, w toku prowadzonych badań wykonano testy przeżywalności bakterii w obecności Cr(VI) poprzez określenie minimalnego stężenia hamującego, zmian gęstości optycznej, liczebności komórek. Wyróżniono też szczepy o zróżnicowanej oporności na chrom. Doktorantka szczegółowo opisała wyniki przeprowadzonych testów, zwracając uwagę na szczególnie ciekawe i nowe dane, w tym potwierdziła wysoką oporność szczepu *Bacillus cereus* ZB001 oraz klonu tego szczepu wyselekcjonowanego w wyniku traktowania subletalnym stężeniem (100 mM) Cr(VI). Stwierdziła, że oporność tych szczepów związana jest z wytwarzaniem formy pośredniej chromu Cr(V), a proces redukcji zachodzi na drodze enzymatycznej, co wykazano za pomocą barwienia zymograficznego, wskazującego na indukcję reduktazy chinonowej. Przeprowadzone analizy proteomu szczepu ZB001 potraktowanego 1 mM Cr(VI) wykazały zmiany w syntezie 34 białek, co wg Doktorantki sugeruje przystosowanie bakterii do niekorzystnych warunków środowiskowych. Testy przeprowadzone na szczepach innych gatunków bakterii (*Pseudomonas alcaligenes* 12, *Burkholderia cepacia* 33) wskazywały na inne mechanizmy obrony w warunkach stresu, jak np. mechanizm wyrzutu Cr(VI) z komórki u *P. alcaligenes* 12, natomiast u *B. cepacia* 33 mechanizm akumulacji Cr. Doktorantka uznała, że wobec tego szczep *B. cepacia* 33 może być przydatny w procesie bioremediacji.

Szczepy drożdży z gatunku *Pichia guilliermondii* (model II) były już badane pod względem oporności na Cr(VI) przez naukowców z Narodowej Akademii Ukrainy. Badania Doktorantki skupione były na sprawdzeniu, czy szczepy drożdży w obecności Cr(VI) wykazują zdolność do redukcji Cr(VI) do Cr(V). Przeprowadzone testy z dodatkiem egzogennej ryboflawiny wskazały, że witamina B2 (RF) jest czynnikiem sprzyjającym redukcji chromu Cr(VI) przez *Pichia guilliermondii*. Tym samym potwierdzono, że jest to nieenzymatyczny czynnik biorący udział w detoksykacji CR(VI).

Blok przeprowadzonych badań nad reakcjami makrofitów (model III) na zanieczyszczenie chromem uważam za najciekawszy. Rośliny te są naturalnym składnikiem ekosystemów wodnych, choć nie wszystkie gatunki są rodzime dla naszej flory. Makrofity są najczęściej proponowanymi organizmami do fitoremediacji środowiska wodnego i osadów dennych. Interesujące wyniki uzyskała doktorantka poszukując wyjaśnienia, jakie reakcje pozostają podstawą wykształcenia i funkcjonowania mechanizmów tolerancji i adaptacji tych organizmów do warunków stresu. Badania proteomów roślin wodnych przeprowadzone przez Doktorantkę wykazały, że istnieją różnice w reakcji w zależności od gatunku: najwięcej różnic w syntezie białek w stosunku do kontroli obserwowano u *Lemna trisulca* (21), *Spirodela polyrhiza* i *Elodea canadensis* (odpowiednio 13 i 12), a najmniejsze u *Callitriche cophocarpa* (5). Zmiany te dotyczyły zarówno wzmożonej, jak i obniżonej ekspresji białek. Doktorantka wysunęła też tezę, że pojawienie się reduktazy chinonowej u *C. cophocarpa* w odpowiedzi na obecność chromu wskazuje na istnienie u tej rośliny specyficznego mechanizmu detoksykacji chromianu. Badane makrofity bronią się przed toksycznym oddziaływaniem chromu zarówno na drodze enzymatycznej (stwierdzono zmiany aktywności niektórych enzymów antyoksydacyjnych), jak też wzmagając syntezę czynników nieenzymatycznych, takich jak niektóre białka związane z odpowiedzią na stres komórkowy, wykazane w porównawczych analizach proteomicznych.

Dyskusja (Rozdział VI) jest dobrze przeprowadzona. Podobnie, jak w rozdziale *Wyniki*, linią przewodnią są trzy modele (bakteryjny, drożdżowy i roślinny) – grupy badanych organizmów, których reakcje na stres oksydacyjny wywołany obecnością chromu omawiane są na tle szeroko cytowanych danych z literatury. Taki przyjęty schemat prowadzi czytelnika w sposób przejrzysty po olbrzymiej liczbie wyników.

Trzeba przyznać, że przedstawiona rozprawa wyróżnia się bardzo szerokim spektrum prowadzonych badań na trzech różnych grupach obiektów. Podziw budzi nie tylko skrupulatne zaplanowanie i konsekwentna realizacja badań, ale też konieczność opanowania przez Doktorantkę całego szeregu metod analitycznych. Zwraca uwagę krytycyzm Doktorantki w stosunku do interpretacji własnych wyników. Nie zawsze otrzymane wyniki były zgodne z danymi z literatury,

Doktorantka oceniała je i wskazywała na konieczność dalszej weryfikacji poprzez przeprowadzenie kolejnych, dokładniejszych badań, co świadczy o dojrzałości autorki.

Doktorantka zapoznała się z bardzo bogatą literaturą związaną z realizowanymi zagadnieniami. Cytuje ponad 400 pozycji z literatury, głównie anglojęzycznych. Monografia kończy się wnioskami osobno sformułowanymi dla 3 bloków – obiektów badań i wskazaniem, które z badanych organizmów (czy szczepów) mają najkorzystniejsze warunki do zastosowania w bioremediacji zanieczyszczeń środowiska chromem. Jako załącznik podano wykaz odczynników i materiałów użytych w analizach z podaniem ich producenta. Jest też dobrym zwyczajem, a właściwie standardem w pracach fizjologicznych czy biotechnologicznych, podanie na początku pracy rozwinięć skrótów stosowanych w dalszej części rozprawy, co ułatwia korzystanie z tekstu.

Doktorantka zamieszcza w monografii liczne podziękowania dla szeregu osób, które udostępniły materiał biologiczny do jej badań, ale też dziękuje za uwagi i konsultacje, które pozwoliły na to, że osiągnięte wyniki są wartościowe. Wśród tych osób są też uczeni z ośrodków zagranicznych, co świadczy, że doktorantka szeroko konsultowała otrzymane wyniki i ich interpretację.

Zwraca uwagę również fakt, że rozprawa doktorska mgr inż. A. Dubickiej-Lisowskiej jest na ogół napisana dobrą polszczyzną. Konstrukcja poszczególnych zdań jest zgodna z zasadami, lapsusy językowe lub błędy interpunkcyjne są zazwyczaj nieliczne. Strona ilustracyjna, w związku z dużą obszernością pracy, została zbyt mocno „przycięta”. Opisy pod rycinami są często zbyt małe i przez to słabo czytelne.

Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki należy zaliczyć: (1) potwierdzenie u *Callitriche cophocarpa* aktywności reduktazy chinonowej w roślinach poddanych stresowi Cr(VI). Ekspresja tego enzymu nie była indukowana w innych warunkach stresowych, (2) potwierdzenie, że w proteomach roślin inkubowanych w obecności subletalnych stężeń chromianu zmiany obejmowały nieliczne białka, natomiast stres oksydacyjny wywołuje zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych (CAT, SOD, Px), jednakże zmiany te są zróżnicowane w zależności od badanego gatunku makrofita, (3) wykrycie zwiększonej oporności na Cr(VI) szczepu *Pseudomonas alcaligenes* 31 (tolerowanie stężenia do 35 mM) oraz *Bacillus cereus* ZB001 (powyżej 100 mM), (4) potwierdzenie, że szczepy aktywnie redukujące Cr(VI) – *Bacillus cereus* ZB001 i *Pseudomonas* sp. 31 oraz akumulujące chrom – *Burkholderia cepacia* 33 mają wysoki potencjał do zastosowania w bioremediacji, (5) wykazanie, że klony szczepów bakterii o ulepszonych właściwościach i tym samym większej przydatności przemysłowej (dla praktyk remediacyjnych) można uzyskać standardowymi metodami selekcyjnymi. Doktorantka uzyskała szczep *Bacillus cereus* ZB001-2 wykazujący podwyższoną tolerancję na Cr(VI) od szczepu ZB001, z którego został wyselekcjonowany, (6) potwierdzenie, że ryboflawina jest dodatnim

czynnikiem wspomagającym redukcję Cr(VI) do Cr(V) przez drożdże z gatunku *Pichia guilliermondii*. Ryboflawina wpływa też na oporność drożdży na chrom.

Nie mam zastrzeżeń do wyników i ich interpretacji, ale prosiłabym Doktorantkę o krótkie odpowiedzi poszerzające 3 zagadnienia:

(1) Do swoich badań Autorka wybrała trzy modele badawcze – bakterie, drożdże i rośliny. Te ostatnie były reprezentowane przez makrofity. Nasuwa się pytanie, czy taki dobór modelu badawczego związany był ze szczególną przydatnością roślin wodnych do fitoremediacji zanieczyszczeń chromianami? Co wyróżnia te rośliny w aspekcie możliwych zastosowań biotechnologicznych w zestawieniu z roślinami lądowymi, u których przecież stwierdza się często większą tolerancję na chrom i inne metale ciężkie?

(2) Mgr Dubicka-Lisowska wskazała na szczególnie interesujący mechanizm bioremediacji chromu(VI) z postulowanym udziałem układów nieenzymatycznych, mianowicie biologiczną redukcję chromianu z udziałem ryboflawiny, wytwarzanej endogennie przez drożdże bądź dodawanej do podłoża. Mechanizm działania ryboflawiny jest, jak wykazała Doktorantka w badaniach, złożony, a obecność RF stymuluje redukcję Cr(VI), co udokumentowała zwłaszcza w podłożach hodowlanych (nadsączach). Jaka jest pewność, że obserwowany proces nie ma charakteru enzymatycznego? Skąd wiadomo, że RF nie jest na przykład wykorzystywana jako kofaktor enzymów wytwarzanych przez drożdże?

(3) Doktorantka w swojej pracy zwróciła uwagę na trudności związane z pozyskaniem ekstraktów białkowych badanych roślin wodnych. Analizy wymagały wprowadzenia procedur optymalizujących przygotowanie próbek do elektroforezy dwukierunkowej. Niemniej jednak, porównując profile białkowe 2DE uzyskane dla bakterii *Bacillus cereus* oraz dla roślin widać, że liczba plamek białkowych uzyskana podczas mapowania białek bakteryjnych jest znacznie większa niż w przypadku makrofitów. Należałoby oczekiwać, że w żelach otrzymanych dla badanych gatunków makrofitów uwidoczni się znacznie więcej – niż kilkadziesiąt – białek. Proszę o komentarz, czy poczynione obserwacje związane są z ograniczeniami metodycznymi, czy też są skutkiem innych zjawisk lub procesów związanych ze specyfiką testowanych modeli roślinnych.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska **mgr inż. Aleksandry Dubickiej-Lisowskiej** pt. „Charakterystyka enzymatycznych i nieenzymatycznych mechanizmów bioremediacji chromianu u wybranych drobnoustrojów pro- i eukariotycznych oraz makrofitów” jest dziełem oryginalnym i dojrzałym oraz

(1) wnosi oryginalny wkład z zakresu wyjaśniania mechanizmów tolerancji i oporności wybranych szczepów bakterii na Cr(VI), nowe dane dotyczące roli ryboflawiny w redukcji Cr(VI) do Cr(V) przez drożdże i wpływ tego biologicznie aktywnego czynnika na oporność na chrom tych organizmów oraz nowe dane dotyczące zmian w proteomie makrofitów poddanych oddziaływaniu subletalnych stężeń chromianu. Określono też zróżnicowane kierunki zmian aktywności enzymów antyoksydacyjnych u badanych makrofitów. Wykazano również, że ekspresja NAD(P)H-zależnej dehydrogenazy chinonowej (FQR1) jest odpowiedzią na obecność chromianu u *Callitriche cophocarpa*. Wysłunięto przypuszczenie, że białko to może być elementem szlaku detoksykacji chromianu i w konsekwencji uczestniczy w enzymatycznej redukcji Cr(VI) do form mniej szkodzących komórkom,

(2) spośród badanych organizmów – modeli wskazano realne możliwości zastosowania kilku z nich (*Callitriche cophocarpa*, *Burkholderia cepacia* 33, *Bacillus cereus* ZB001, *Pseudomonas alcaligenes* 31 oraz szczep *Pichia guilliermondii* rib81) w bioremediacji zanieczyszczeń środowiskowych, w tym dwóch pierwszych wykazujących zdolność do akumulacji chromu, a pozostałych – cechujących się przeżywalnością w warunkach wysokich obciążeń dzięki zdolności do aktywnej redukcji Cr(VI),

(3) praca stanowi spójne rozwiązanie problematyki, która była celem zaplanowanych w ramach rozprawy doktorskiej badań,

(4) doktorantka wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną i umiejętność samodzielnego prowadzenia prac naukowych.

Z pewnością podkreślić należy również ogrom pracy włożonej w powstanie tej dysertacji. Badania zostały przeprowadzone poprawnie pod względem metodycznym, a Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością literatury, jak też umiejętnością krytycznej interpretacji otrzymanych wyników. Rozprawa doktorska **mgr inż. Aleksandry Dubickiej-Lisowskiej** spełnia zatem wymagania stawiane dysertacjom doktorskim, wynikające z Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595, z późniejszymi zmianami) i w związku z powyższym wnoszę do Rady Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie o dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Mając na uwadze powyższe argumenty, jak też szczególnie podkreślając szeroki zakres prowadzonych badań, oryginalność otrzymanych wyników, ich dogłębne opracowanie i już częściowe opublikowanie, wnoszę do wysokiej Rady wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Dubickiej-Lisowskiej stosowną nagrodą.

