



Poznań, 20.06.2016 r.

Prof. dr hab. Adam Kaznowski

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

Przedstawiona do recenzji dysertacja doktorska została napisana pod kierunkiem pani prof. dr hab. Izabeli Świącickiej w Uniwersytecie w Białymstoku. W rozprawie wyróżniono następujące rozdziały: streszczenie, wstęp, wydruk trzech opublikowanych artykułów zawierających wyniki, podsumowanie, wnioski, piśmiennictwo oraz oświadczenia współautorów publikacji. Rezultaty zawarto w następujących wieloautorskich pracach, opublikowanych w czasopismach zamieszczonych na listach Journal Citation Reports i A Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego:

1. I. Świącicka, M. Bartoszewicz, D. Kaswulyte-Creasey, J.M. Drewnowska, E. Murawska, A. Yernazarova, E. Łukaszuk, J. Mahillon: „Diversity of thermal ecotypes and potential pathotypes of *Bacillus thuringiensis* soil isolates”, FEMS Microbiol Ecol., 2013, 85, 262-272. IF=3,53 (MNiSW 35 pkt.).
2. J.M. Drewnowska, I. Świącicka: “Eco-genetic structure of *Bacillus cereus sensu lato* populations from different environments in northeastern Poland”, PLOS One, 2013, 8, e80175, s. 1-11. IF=3,534 (MNiSW 40 pkt.).
3. J.M. Drewnowska, M. Zambrzycka, B. Kalska-Szostko, K. Fiedoruk, I. Świącicka: “Melanin-like pigment synthesis by soil *Bacillus weihenstephanensis* isolates from northeastern Poland”, PLOS One, 2015, 10, e125428, s. 1-15. IF=3,057 (MNiSW 40 pkt.).

Ze złożonych oświadczeń mgr Justyny Małgorzaty Drewnowskiej i współautorów ww. artykułów wynika, że Doktorantka miała znaczący udział w realizacji części doświadczalnej, opracowaniu wyników i przygotowaniu publikacji. Ponadto, Doktorantka jest współautorką koncepcji pracy, finansowanej z przyznanego jej grantu NCN, której wyniki opublikowano w PLOS One, 2015, 10, e125428, s. 1-15.

Praca doktorska poświęcona jest określeniu genetycznej struktury oraz podłoża ekologicznego dywersyfikacji szczepów bakterii *Bacillus cereus s.l.* wyizolowanych z gleby. Badania przeprowadzono na 297 izolatach wyhodowanych z próbek gleby pobranych w Narwiańskim Parku Narodowym,



Białowieskim Parku Narodowym, Biebrzańskim Parku Narodowym i gospodarstwie rolnym w Jasieniówce. W pierwszej pracy analizowano również szczepy wyizolowane na terenie Litwy.

We wstępie rozprawy doktorskiej Autorka przedstawiła trzy hipotezy badawcze sformułowane przez nią i promotora:

- 1) Poszczególne linie genetyczne *B. cereus s.l.* zawierają szczepy mające te same specyficzne właściwości ekologiczne kodowane przez chromosomalne geny,
- 2) W poszczególnych siedliskach występują różne genotypy (ekotypy) *B. cereus s.l.*
- 3) Środowiskowe szczepy *B. cereus s.l.* są wysoko spokrewnione i powinny być klasyfikowane jako jeden gatunek.

W pierwszej pracy autorzy badali zróżnicowanie glebowych izolatów *B. thuringiensis* techniką MLST i starali się określić czy bakterie zaadaptowały się do wzrostu w niskiej temperaturze (7°C). Analiza MLST, oparta na sekwencjonowanie siedmiu genów metabolizmu podstawowego, wykazała obecność wśród izolatów dziewięciu linii genetycznych. Około 1/3 szczepów była psychrotolerancyjna. W DNA poszczególnych szczepów oznaczono techniką PCR obecność genów kodujących enterotoksyny oraz toksyny *B. anthracis*. Wkład Doktorantki w tej pracy polegał na wykonaniu testu psychrotolerancji oraz określeniu występowanie genu *cytK* w DNA izolatów. Bakterie mające ww. gen były związane z dwoma liniami filogenetycznymi wyznaczonymi techniką MLST. Uzyskane wyniki wykazały, że szczepy zaliczane do *B. thuringiensis* są zróżnicowane ewolucyjnie, a poszczególne linie genetyczne mają specyficzne właściwości ekologiczne.

W kolejnej publikacji, autorstwa Justyny Drewnowskiej i Izabeli Święcickiej, zawarto wyniki bardzo obszernych badań dotyczących genetycznej struktury *B. cereus s.l.*. Analiza wyników, uzyskanych metodą MLST, wykazała wśród 273 izolatów 19 grup klonalnych i 80 pojedynczych, niespokrewnionych szczepów. Przeszło 74% izolatów zostało zgrupowanych w skupieniu zawierającym środowiskowe *B. cereus s.l.*, natomiast 11% z klinicznymi a 15% z referencyjnymi szczepami *B. cereus* i *B. thuringiensis*. Szczepy psychrotolerancyjne zostały skupione ze środowiskowymi, natomiast bakterie mające gen *cytK* były obecne we wszystkich grupach bakterii wyizolowanych z próbek gleby uprawnej. Badania udowodniły zróżnicowanie genotypów szczepów *B. cereus s.l.* wśród populacji występujących w naturze podczas gdy szczepy kliniczne wykazały wysoki stopień podobieństwa filogenetycznego. Udział



Doktorantki w realizacji tej pracy był dominujący i polegał na izolacji i identyfikacji bakterii, wykonaniu testów psychro- i termo- tolerancji, izolacji DNA, określeniu występowanie genów δ -endotoksyn i *cytK*, analizie MLST oraz obliczeniach bioinformatycznych z wykorzystaniem 6 programów komputerowych.

W trzeciej publikacji wchodzącej w skład cyklu prac składających się na dysertację doktorską mgr Justyny Małgorzaty Drewnowskiej zawarto wyniki różnicowania genetycznego i biochemicznego oraz właściwości psychrotolerancji i zdolności do syntezy pigmentu melaninowego szczepów *B. weihenstephanensis*, wyhodowanych z próbek gleby pobranych w północno-wschodniej Polsce. Udział Doktorantki w realizacji tej pracy był znaczny, selekcionowała ona szczepy wytwarzające pigment i charakteryzowała je biochemicznie oraz genetycznie metodą PFGE, przygotowała także manuskrypt do publikacji. Praca była finansowana z grantu NCN Preludium 2013/09/N/Nz8/03209 przyznanego Justynie Małgorzacie Drewnowskiej. Izolaty wykazały wysokie pokrewieństwo z referencyjnym szczepem *B. weihenstephanensis* DSMZ 11821. Dużym osiągnięciem tej pracy było wykazanie, że synteza pigmentu melaninowego była związana z aktywnością lakkazy i wydaje się, że jest lokalną adaptacją bakterii do specyficznej niszy. Być może pigment ten w przyszłości będzie wykorzystany w różnych aplikacjach ponieważ jest rozpuszczalny w wodzie w przeciwieństwie do dostępnego komercyjnie nierozpuszczalnego.

W podsumowaniu Doktorantka wymienia najważniejsze osiągnięcia dysertacji i omawia je krytycznie odwołując się do piśmiennictwa. Justyna Małgorzata Drewnowska zwraca uwagę na duże genetyczne różnicowanie populacji *B. cereus s.l.* i wskazuje, że ta heterogenność jest przeważnie wynikiem mutacji. Różnicowanie genetyczne występujące w populacjach *B. cereus s.l.* pozwala tym bakteriom na adaptacje do różnych nisz ekologicznych prowadząc do wykształcenia odrębnych ekotypów. Niektóre sformułowane we wstępie hipotezy badawcze zostały pozytywnie zweryfikowane, np. o występowaniu różnicowanych ekotypach temperaturowych oraz ekotypu melaninowego. Wyniki badań nie potwierdziły jednak związku pomiędzy cytotoksycznością izolatów a przynależnością ich do poszczególnych linii genetycznych. Analiza MLST wykazała, że przeszło 92% typów sekwencyjnych jest charakterystycznych dla poszczególnych środowisk, co wskazuje na występowanie specyficznych genotypów wśród szczepów naturalnych populacji *B. cereus s.l.*



Dyskusyjne było sformułowanie trzeciej hipotezy sugerującej, że środowiskowe szczepy *B. cereus s.l.* są wysoko spokrewnione i powinny być klasyfikowane jako jeden gatunek. Moim zdaniem brakowało wystarczających przesłanek uzasadniających jej postawienie. Hipoteza nie została pozytywnie zweryfikowana, natomiast autorka zaproponowała różnicować szczepy *B. cereus s.l.* na dwie grupy, środowiskową i obejmującą szczepy „kliniczne”. Sądzę, że nie jest to dobra propozycja aby bakterie różnicować ze względu na ich pochodzenie a nie polimorfizm genetyczny, fenotypowy i właściwości biologiczne. Szkoda, że Doktorantka w dysertacji obszerniej nie omówiła współczesnych koncepcji i proponowanych definicji gatunku organizmu prokariotycznego oraz kryteriów dywersyfikacji wewnątrzgatunkowej. Myślę, że umożliwiłoby to wnikliwszą interpretację otrzymanych wyników.

Rozprawę kończy pięć wniosków oraz piśmiennictwo. W pierwszym wniosku zawarto tezę o powszechnej adaptacji szczepów *B. cereus s.l.* z terenu Polski północno-wschodniej do wzrostu w niskiej temperaturze. Moim zdaniem wniosek powinien być uzupełniony o informację, że dotyczy bakterii występujących w glebie. Ponadto, nie jestem do końca przekonany czy można taki wniosek sformułować, jeżeli w pierwszej publikacji tylko 1/3 izolatów była psychrotolerancyjna. Szczepy te wyizolowano z gleby leśnej pobranej w Narwiańskim Parku Narodowym jak i na terenie Litwy. Gdyby uwzględnić tylko izolaty z terenu Polski to psychrotolerancyjnych było 41,7%, trudno więc mówić o powszechności takiej adaptacji. Nie zgłaszam uwag do wniosków 2-4, natomiast jak wspomniałem powyżej, dyskusyjna jest propozycja różnicowania szczepów *B. cereus s.l.* na podgrupy, środowiskową i kliniczną (wniosek nr 5). Zwracam uwagę, że taki podział ma raczej charakter ekologiczny a nie taksonomiczny.

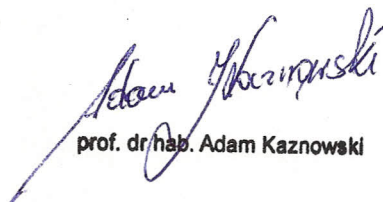
Rozprawę doktorską pani Justyny Małgorzaty Drewnowskiej oceniam wysoko. Taksonomia *B. cereus s.l.* jest kontrowersyjna, a różnicowanie gatunków (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* i *B. weihenstephanensis*) jak i wewnątrzgatunkowe w obrębie tej grupy bakterii jest trudne. Podjęcie się tego zagadnienia było więc jak najbardziej uzasadnione. Do realizacji celu pracy i weryfikacji postawionych hipotez prawidłowo dobrano liczne metody badań, uwzględniając zarówno konwencjonalne testy biochemiczne i fizjologiczne jak i najnowsze techniki molekularne. W pracy uzyskano ważne i oryginalne rezultaty, znacznie poszerzające wiedzę o zróżnicowaniu genetycznym, ekologicznym, fenotypowym i biochemicznym *B. cereus s.l.* Wyniki zostały bardzo umiejętnie i krytycznie przedyskutowane na tle najnowszego piśmiennictwa. Moje uwagi nie umniejszają wysokiej



oceny rozprawy doktorskiej a mają charakter dyskusji naukowej. Strona formalna pracy nie budzi zastrzeżeń.

Przedstawiona do oceny rozprawa, w moim przekonaniu, w pełni spełnia wymagania stawiane dysertacjom doktorskim, określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65, poz. 595, Dz. U. z 2005 r., nr 164, poz. 1365, Dz. U. z 2011 r., nr 84, poz. 455 z późniejszymi zmianami) i dlatego przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku wniosek o dopuszczenie mgr Justyny Małgorzaty Drewnowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Mgr Justyna Małgorzata Drewnowska przeprowadziła badania wielokierunkowe, kompleksowe i w realizację zadań włożyła ogrom pracy. Ważne i oryginalne wyniki otrzymane przez Doktorantkę stanowią istotny wkład do wiedzy. Zostały już opublikowane w znakomitych czasopiśmie i choć niedawno się ukazały już kilkanaście razy je cytowano. Uważam, że ze względu na wysoką wartość merytoryczną dysertacja mgr Justyny Małgorzaty Drewnowskiej zasługuje na wyróżnienie, o co wnoszę do Rady Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku.


prof. dr/hab. Adam Kaznowski