



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii

dr hab. Renata Matlakowska, prof. ucz.
Pracownia Analizy Skazań Środowiska



Warszawa, 18.07.2019

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Sylwii Marjańskiej

pt. „Filogeneza i zmienność genomowa przedstawicieli *Bacillus cereus sensu stricto*
z gleb Eurazji, Afryki i Ameryki Południowej“

Przedmiot rozprawy i ocena formalna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku pod kierunkiem prof. dr hab. Izabeli Święcickiej. Tematyka pracy dotyczy genomiki czterech glebowych populacji laseczki *Bacillus cereus* reprezentowanych przez 161 izolatów. Oryginalność pracy polega przede wszystkim na pochodzeniu materiału badawczego - bakterie zostały wyizolowane z gleby pochodzącej z odległych lokalizacji geograficznych, tzn. z czterech krajów (Polska, Kazachstan, Kenia i Argentyna) zlokalizowanych na trzech kontynentach (Eurazja, Afryka i Ameryka Południowa), oraz na zastosowaniu kompleksowej analizy molekularnej. Takie podejście eksperymentalne umożliwiło uzyskanie oryginalnej charakterystyki genomów przedstawicieli oraz całych populacji *B. cereus* w wymiarze międzykontynentalnym. Tematyka podjęta w pracy jest częścią badań prowadzonych w Zakładzie Mikrobiologii UwB nad ekologią molekularną i genetyką bakterii *B. cereus*, które stanowią istotny komponent mikrobiomu glebowego, a także są ważnym czynnikiem wpływającym na zdrowie i gospodarkę człowieka.

Rozprawa doktorska została napisana w języku polskim i ma prawidłowy układ typowy dla prac eksperymentalnych. Praca obejmuje 111 stron maszynopisu i jest podzielona na klasyczne rozdziały: wstęp, cele badawcze i hipotezy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski oraz bibliografia. Tytuł pracy odzwierciedla jej treść. Pracę uzupełnia streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis tabel i rycin. W pracy przedstawiono 27 tabel i 21 rycin umieszczonych w tekście oraz jedną tabelę i dwie ryciny umieszczone w załącznikach. Bibliografia

zawiera 111 prac naukowych; znaczna część literatury pochodzi z ostatniej dekady. Rozprawa jest przygotowana starannie pod względem edytorskim i językowym.

Ocena dorobku naukowego Doktorantki

Na dorobek Doktorantki składają się cztery oryginalne prace badawcze opublikowane w czasopismach z listy JCR, w tym jedna obejmująca wyniki przedstawione w ramach rozprawy doktorskiej. Łączny IF prac wynosi 11,86.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Wstęp do rozprawy doktorskiej koncentruje się na czterech zagadnieniach: (i) charakterystyce laseczek *B. cereus sensu stricto*, (ii) filogenezie bakterii, (iii) zależności między ekotypowym charakterem populacji bakteryjnych a filogenezą oraz (iv) zależności między zmiennością genetyczną a strukturą populacji. Rozdział ten, chociaż liczy jedynie osiem stron, jest dobrym i wyczerpującym wprowadzeniem teoretycznym do części eksperymentalnej rozprawy.

W kolejnym rozdziale (cele badawcze i hipotezy) Doktorantka przedstawiła pięć głównych celów oraz dwie hipotezy badawcze. Jako kluczowe cele badań wskazała określenie: (i) stopnia polimorfizmu genetycznego; (ii) struktury genetycznej; (iii) powiązań filogenetycznych; (iv) domniemanych ekotypów oraz dynamiki ewolucyjnej, a także (v) frekwencji i wybranych właściwości plazmidów typu pXO1 i pXO2 czterech glebowych populacji *B. cereus*. Założono, że (i) glebowe izolaty pochodzące z odległych geograficznie lokalizacji są polimorficzne i tworzą odrębne linie filogenetyczne, a także (ii) są nosicielami ww. plazmidów. Wszystkie postawione cele badawcze są istotnym elementem badań genomiki bakterii i populacji, ale szczególnie interesujący wydaje się być cel dotyczący ustalenia domniemanych ekotypów stanowiących podstawową jednostkę specjacji ekologicznej. Identyfikacja i charakterystyka ekotypów może dostarczyć informacji na temat stopnia zróżnicowania genetycznego i potencjalnej kolonizacji nowych nisz ekologicznych.

Opis materiałów i metod jest bardzo dokładny. Materiał badawczy stanowiła kolekcja 161 izolatów *B. cereus* i osiem szczepów referencyjnych. W badaniach wykorzystano metodę MLST (multi-locus sequence typing) analizując sekwencje nukleotydowe fragmentów siedmiu genów metabolizmu podstawowego. W celu poznania polimorfizmu genetycznego badanych populacji glebowych wyznaczono profile alleliczne sekwencji nukleotydowych oraz bazując na unikatowej kombinacji alleli określono typy sekwencyjne izolatów. Strukturę genetyczną glebowych populacji *B. cereus* oznaczono na podstawie profili allelicznych typów sekwencyjnych, w tym wyznaczono kompleksy klonalne oraz singletony. Pokrewieństwo filogenetyczne izolatów wyznaczono w oparciu

o sekwencje nukleotydowe typów sekwencyjnych, a domniemane ekotypy ustalano za pomocą algorytmu Ecotype Simulation. Dodatkowo, polimorfizm genomowy wybranych izolatów zbadano w oparciu o wzory elektroforetyczne fragmentów restrykcyjnych genomowego DNA w zmiennym pulsowo polu elektrycznym oraz na podstawie analiz porównawczych genów kodujących homologii białek replikacji plazmidów typu pXO1 i pXO2, tj. ich frekwencji i stopnia ich ekspresji. Do analiz molekularnych wykorzystano 13 programów bioinformatycznych.

W wyniku przeprowadzonych badań uzyskano dużą ilość danych, które zaprezentowano w sposób syntetyczny i uporządkowany. Rozdział wyniki został podzielony na sześć części odzwierciedlających główne zadania badawcze. Doktorantka opisuje wyniki w sposób przejrzysty i dokładny posługując się swoistym schematem (opis poszczególnych populacji, a następnie podsumowanie wyników w aspekcie międzykontynentalnym); jest to bardzo dobre rozwiązanie gdyż ułatwia czytelnikowi zrozumienie pracy i uporządkowanie danych. Uzyskane wyniki są zilustrowane na 20 bardzo dobrych rycinach.

W oparciu o uzyskane wyniki można stwierdzić, że cel rozprawy został zrealizowany i jest dobrze udokumentowany. Do najważniejszych osiągnięć rozprawy doktorskiej należy zaliczyć wykazanie, że populacje *B. cereus* występujące w różnych lokalizacjach geograficznych charakteryzuje wysoki stopień polimorfizmu genetycznego. W badanych populacjach stwierdzono 354 allele genów metabolizmu podstawowego; nie zidentyfikowano ani jednej sekwencji genów wspólnej dla wszystkich populacji, ale stwierdzono występowanie homologów genów w różnych populacjach jednocześnie. Wśród badanych izolatów opisano 116 typów sekwencyjnych, w tym 89% zidentyfikowano po raz pierwszy. Analiza filogenetyczna pokazała pokrewieństwo izolatów, a jednocześnie formowanie przez nie odrębnych linii filogenetycznych. Wśród izolatów wyróżniono pięć kładów, częściowo skorelowanych z miejscem izolacji, ale warto podkreślić, że w żadnym z nich nie skupiły się izolaty pochodzące z jednego kontynentu. Sugeruje to formowanie oddzielnych linii filogenetycznych skorelowanych z pochodzeniem, ale jednocześnie pokazuje występowanie pokrewnych genotypów w odległych lokalizacjach. Ponadto wśród badanych izolatów wyodrębniono 60 domniemanych ekotypów w większości tworzonych przez bakterie pochodzące z tej samej lokalizacji. Wspólną cechą wszystkich badanych populacji jest zerowa wartość dryfu genetycznego. Wysoki stopień polimorfizmu genetycznego wybranych izolatów *B. cereus* potwierdzono poprzez analizę porównawczą ich pulsotypów aczkolwiek ich unikalność pokazano zarówno w obrębie izolatów należących do tego samego typu sekwencyjnego, jak i pochodzących z tej samej lokalizacji. We wszystkich badanych populacjach zidentyfikowano *B. cereus* posiadające plazmidy typu pXO1 i pXO2; wykazano zróżnicowaną ekspresję białek replikacji tych plazmidów oraz potwierdzono, że

plazmidy te charakteryzują się zmiennością nukleotydową w miejscach inicjacji replikacji oraz jego otoczeniu w porównaniu do *B. anthracis*.

Dyskusja wyników jest napisana poprawnie; Doktorantka dokonuje w niej przeglądu uzyskanych wyników oraz porównuje je z danymi pochodzącymi z literatury. Rozdział ten jest solidnym i według mnie najciekawszym fragmentem rozprawy. Pracę kończy sześć wniosków, które są poprawnie sformułowane i pokazują zdolność Doktorantki do syntetycznego podsumowania uzyskanych wyników.

Podsumowując, chciałabym stwierdzić, że ocenia rozprawa doktorska prezentuje wysoki poziom naukowy. Przeprowadzone w niej kompleksowe analizy genetyczne puli izolatów pochodzących z trzech kontynentów wnoszą oryginalne dane dotyczące ekologii molekularnej *B. cereus* w aspekcie międzykontynentalnym. Ze względu na złożoność tematyki badawczej i podjętą przez Doktorantkę dyskusję wyników pojawiają się jednak pytania związane z ich interpretacją. Pytania te dotyczą przede wszystkim związku pomiędzy uzyskaną różnorodnością genotypów wśród badanych populacji a odległością geograficzną i środowiskiem. Doktorantka w oparciu o literaturę sugeruje, że istnienie wśród populacji odrębnych genotypów jest prawdopodobnie wynikiem adaptacji do specyficznych warunków środowiskowych. W związku z powyższym proszę przedyskutować poniżej wymienione kwestie:

1. Jeżeli różnorodność genotypów i zróżnicowanie struktury genetycznej populacji jest związane z warunkami środowiska (np. klimat) oraz fizyczno-chemicznymi właściwościami gleby, to jak uzasadnić porównywanie populacji bakterii izolowanych z różnych lokalizacji geograficznych, ale jednocześnie ze znacząco odmiennych rodzajów gleb. W przypadku Argentyny gleba do izolacji pochodziła z parku miejskiego w Buenos Aires; dla Kazachstanu podano, że gleba pochodziła w okolic Almaty; w przypadku Kenii próbki pobierano na terenie dwóch parków narodowych, a w Polsce na terenie dwóch parków narodowych i gospodarstwa rolnego. Na przykład, w dyskusji Doktorantka zauważa, że populacja kenijska charakteryzuje się najwyższą heterogenicznością, co uzasadnia potencjalną mnogością mikronisz na terenie kenijskich parków narodowych; jednocześnie w oparciu o literaturę sugeruje jako przyczynę tego zjawiska brak ingerencji antropogenicznej na tym terenie.
2. Proszę o wyjaśnienie strategii wyboru izolatów do badań. Izolaty zostały wybrane losowo - 161 z puli 713, ale co zdecydowało o ich liczbie w poszczególnych populacjach, z np. wybrano 23 izolaty argentyńskie z puli 200; 50 izolatów polskich z puli 103, itp.
3. Doktorantka wielokrotnie podkreśla znaczenie czynników środowiskowych w ewolucyjnym kształtowaniu populacji, w tym ich wpływ na różnorodność struktury genetycznej populacji i ich ekotypowy charakter. Czy zatem w przyszłości istnieje możliwość skorelowania uzyskanych

danych z warunkami środowiskowymi i/lub właściwościami fizyczno-chemicznymi gleb wykorzystanych do izolacji *B. cereus*?

4. Czy dostępne są dane dotyczące charakterystyki fenotypowej badanych izolatów lub czy planowane są takie analizy, szczególnie dotyczące np. zakresu tolerowanych temperatur? Doktorantka wskazuje temperaturę, w tym warunki klimatyczne, jako istotny czynnik kształtujący populację *B. cereus*. Czy izolaty pochodzące z gleb pobranych w Polsce i Kazachstanie wykazują psychrotolerancję?
5. Proszę o wyjaśnienie dlaczego uzyskane w pracy genomowe profile elektroforetyczne wybranych izolatów (pulsotypy PFGE) nie są skorelowane z wynikami MLST; czy spodziewano się korelacji?
6. Proszę o informację o aktualnym stanie wiedzy na temat filogenezy i struktury populacji bakterii w oparciu o analizę metagenomów i opinię na temat znaczenia tego rodzaju badań w poznaniu genetyki populacji mikroorganizmów.

Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wskazuje na wiedzę Doktorantki oraz umiejętność prowadzenia przez nią badań naukowych. Rozprawa w pełni spełnia wymogi formalne dla prac doktorskich zawarte w Ustawie o stopniach i tytułach naukowych z dnia 14 marca 2003 (Dz. U. 2017, poz. 1789) z późniejszymi zmianami. W związku z powyższym wnoszę do Rady Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku o dopuszczenie mgr Pauliny Sylwii Marjańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie doceniając wysoką wartość merytoryczną i nowatorski charakter uzyskanych wyników oraz ich częściowe opublikowanie w uznanym czasopiśmie wnoszę o wyróżnienie rozprawy przez Radę Wydziału stosowną nagrodą.

Justa Motylowska