



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Mikrobiologii
Zakład Genetyki Bakterii
prof. dr hab. Dariusz Bartosik



Warszawa, 12.06.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Jakuba Lacha, pt.

„Charakterystyka bioróżnorodności i potencjału biotechnologicznego mikroorganizmów halofilnych”

(ang. Characteristics of biodiversity and biotechnological potential of halophilic microorganisms)

**wykonanej w Katedrze Mikrobiologii Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego,
pod kierunkiem:**

**dr. hab. Pawła Stączka, prof. Uł (promotor rozprawy) i
dr Agnieszki Matery-Witkiewicz (promotor pomocniczy)**

Prokaryoty są organizmami „wszędobylskimi”. Dzięki niezwykle zróżnicowanym właściwościom metabolicznym oraz szerokim zdolnościom adaptacyjnym mogą one zasiedlać niemal wszystkie środowiska naszej planety, w znaczący sposób kształtując jednocześnie skład i właściwości biosfery. Szczególną ciekawość badaczy budzą, zdominowane przez mikroorganizmy, środowiska ekstremalne, w których panują warunki niekorzystne dla rozwoju innych form życia. Scharakteryzowanie występujących tam mikroorganizmów, ich mechanizmów adaptacyjnych i specyficznych właściwości, stanowi ważne i ciekawe wyzwanie badawcze – tym większe, że wiele tego typu środowisk słabo dotąd poznano pod względem mikrobiologicznym. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa wpisuje się w ten nurt tematyczny, dotyczy bowiem analiz mikroorganizmów halofilnych, zasiedlających środowiska o wysokim stopniu zasolenia. Zasadniczym celem ocenianej pracy doktorskiej było scharakteryzowanie bioróżnorodności mikrobiomów wybranych zasolonych środowisk z terenu naszego kraju oraz dokonanie oceny potencjału biotechnologicznego występujących tam mikroorganizmów. Wybór podjętej tematyki badawczej uważam za w pełni zasadny. Niesie ona duży potencjał, a realizacja postawionego celu naukowego stwarza możliwość uzyskania wyników o dużych walorach poznawczych, istotnych zarówno z punktu widzenia badań podstawowych, jak i ze względów praktycznych.

Badania przeprowadzone przez Doktoranta zostały przedstawione w rozprawie w formie zbioru powiązanych tematycznie artykułów naukowych – jednego przeglądowego i czterech o charakterze eksperymentalnym. Dwa z nich zostały już opublikowane (w 2021 i 2023 r.), dwa kolejne zaakceptowane do druku – wszystkie w międzynarodowych czasopismach naukowych, a ostatni

znajduje się obecnie w ocenie recenzentów. Zamieszczone w rozprawie artykuły poprzedza kilka krótkich rozdziałów o układzie typowym dla klasycznych rozpraw doktorskich – znajdujemy tu zatem (a) krótki *Wstęp* opisujący organizmy halofilne, (b) *Cel* naukowy (w pracy nie sformułowano jednak hipotez badawczych), (c) *Materiały i metody*, (d) *Omówienie wyników*, (e) *Wnioski*, (f) *Bibliografię* oraz (g) *Streszczenie* (również w języku angielskim). W mojej opinii *Streszczenie* powinno rozpoczynać rozprawę, wówczas jego lektura już na wstępie daje czytelnikowi ogólne wyobrażenie o zakresie przeprowadzonych prac. Zamieszczenie tego rozdziału na końcu opisu powoduje, że jest on odbierany jedynie jako powtórzenie poznanych wcześniej treści (nie bez kozery wszystkie publikacje naukowe rozpoczyna abstrakt). Na początku rozprawy zamieszczono natomiast dane na temat dorobku Doktoranta (m.in. spis prac opublikowanych z Jego udziałem oraz odbytych staży naukowych), które, chociaż nie podlegają ocenie, przynoszą informacje świadczące o tym, że okres studiów doktoranckich Pana mgr. Jakuba Lacha był owocny pod względem naukowym.

Część wstępna rozprawy została napisana zwięźle, dobrym językiem, oraz starannie opracowana od strony edytorskiej, choć nie jest pozbawiona drobnych niedociągnięć. Przedstawiono w niej starannie dobrane informacje wprowadzające czytelnika do tematyki rozprawy. Scharakteryzowano także zastosowane podejścia metodyczne (do których nie mam zastrzeżeń), a także omówiono wyniki prac eksperymentalnych, punktując najważniejsze osiągnięcia. Całość przedstawiono na tle odpowiednio dobranej, aktualnej bibliografii. Lektura tej krótkiej, acz treściwej, części pracy przekonuje, że Doktorant dysponuje rozległą wiedzą z zakresu podjętej tematyki badawczej, a także potrafi dokonać syntezy zgromadzonych danych i przedstawić je w zwięzłej i atrakcyjnej dla czytelnika formie.

Wszystkie artykuły, stanowiące zasadniczą część rozprawy, są wieloautorskie (od 4 do 7 autorów). Należy podkreślić, że w każdym przypadku Doktorant jest głównym autorem (zajmuje pierwszą pozycję w gronie współautorów oraz jest autorem korespondującym), co wskazuje na Jego wiodącą rolę w badaniach oraz w przygotowaniu manuskryptów publikacji. Znajduje to również odzwierciedlenie w załączonych do rozprawy oświadczeniach. Na ich podstawie można stwierdzić, że Doktorant uczestniczył w opracowaniu koncepcji badań oraz wykazał się umiejętnościami planowania i przeprowadzenia eksperymentów, analizy i interpretacji uzyskanych danych, a także przygotowania tekstu naukowego. Biorąc pod uwagę powyższe informacje, nie mam wątpliwości, że włączenie tych prac do rozprawy było w pełni uprawnione.

Tytuł ocenianej rozprawy brzmi: „*Charakterystyka bioróżnorodności i potencjału biotechnologicznego mikroorganizmów halofilnych*”. Mam do niego pewne zastrzeżenia. Został on sformułowany zbyt ogólnie, przez co wydaje się bardziej odpowiedni dla pracy monograficznej niż badawczej. Dobrym posunięciem byłoby np. określenie w tytule środowisk, z których pochodziły charakteryzowane drobnoustroje.

Cykl artykułów włączonych do rozprawy rozpoczyna praca pogładowa, pt. „*The methods of digging for “gold” within the salt: characterization of halophilic prokaryotes and identification of their valuable biological products using sequencing and genome mining tools*”, która została opublikowana w czasopiśmie *Genes* (IF 4,414). Prezentuje ona nie tylko dogłębny przegląd literatury (200 zacytowanych pozycji), lecz przede wszystkim autorskie spojrzenie na zagadnienia związane z mikroorganizmami halofilnymi przez pryzmat praktycznego wykorzystania tych drobnoustrojów w szeroko pojętej biotechnologii. Szczególnie istotne jest zestawienie i krytyczna ocena metod

badawczych stosowanych *in silico* do identyfikacji genów kodujących molekuly o biotechnologicznym potencjale. Uważam, że jest to bardzo wartościowe opracowanie, które z pewnością doceni każdy, kto planuje rozpoczęcie tego typu badań. Artykuł ten odbieram także jako bardziej szczegółowe rozwinięcie Wstępu rozprawy – przybliży on specyfikę badań nad halofilami, podkreślając jednocześnie istotność wyboru tych mikroorganizmów jako obiektu badawczego.

Praca eksperymentalna, zatytułowana „*First insight into the Polish Bochnia salt mine metagenome*”, opublikowana w czasopiśmie *Environmental Sciences and Pollution Research* (IF 5,190), stanowi główną oś rozprawy. Badania w niej opisane dotyczyły identyfikacji i charakterystyki mikroorganizmów zasiedlających solanki kopalni soli Bochnia. Wybór tej kopalni był bardzo trafny. Endemiczne środowiska kopalniane są szczególnie interesujące dla mikrobiologów, ze względu na izolację oraz stabilność i specyfikę panujących tam warunków. Analiza tych środowisk daje możliwość identyfikacji mikroorganizmów obdarzonych unikatowymi właściwościami, często reprezentujących nowe lub słabo poznane taksony, co potwierdziły również badania przeprowadzone przez Doktoranta. Należy podkreślić, że były to pierwsze badania mikrobiomu kopalni soli przeprowadzone w tak kompleksowym wymiarze. Ich głównym celem było określenie struktury konsorcjów bytujących tam mikroorganizmów oraz ich potencjału genetycznego. Co ważne, analizom poddano próby pobrane w interwałach czasowych z różnych stanowisk i poziomów kopalni, dokonując również analiz parametrów geochemicznych poszczególnych środowisk, co było niezbędne dla właściwej interpretacji danych uzyskanych w kluczowych eksperymentach. Aby uzyskać jak najbardziej kompletny obraz mikrobiomu, zastosowano dwa podejścia eksperymentalne, oparte na analizach ampikonów genów 16S rRNA oraz sekwencji metagenomowego DNA. W efekcie uzyskano informacje na temat stopnia zróżnicowania składu mikrobiomów w poszczególnych analizowanych stanowiskach, ze wskazaniem m.in. grup dominantów i nowych gatunków mikroorganizmów, co omówiono w dyskusji pracy. Doktorant zwrócił także uwagę na fakt, że wybór podejścia metodycznego do badania bioróżnorodności rzutuje na jakość i rzetelność uzyskanych wyników, co niewątpliwie warto jest rozwinięcia podczas obrony rozprawy.

Badania składu taksonomicznego halofili i halotolerantów dopełniły szczegółowe analizy metagenomowego DNA, ukierunkowane na identyfikację informacji genetycznej determinującej przebieg różnych szlaków metabolicznych oraz produkcję metabolitów wtórnych i innych biomolekuł istotnych z praktycznego punktu widzenia. Należy podkreślić, że analizy danych metagenomowych stanowią duże wyzwanie od strony metodycznej. Doktorant znakomicie poradził sobie z tym niełatwym zadaniem, co świadczy o dobrze opanowanym przez Niego warsztacie bioinformatycznym i znajomości dostępnych narzędzi statystycznych i obliczeniowych, z których współczesna biologia coraz częściej korzysta.

Kolejne dwie prace eksperymentalne (*“Draft genomes of halophilic Chromohalobacter and Halomonas strains isolated from brines of the Carpathian Foreland, Poland”* i *“Draft genomes of halophilic Archaea strains isolated from brines of the Carpathian Foreland, Poland”*) opisują badania przeprowadzone według wspólnego scenariusza. Przedstawiają one analizę sekwencji genomów (ang. *draft genomes*) szczepów bakterii i archeonów (wyizolowanych z solanek kopalni Bochnia i położonej opodal Łapczyca), które reprezentowały nieopisane wcześniej gatunki. Dzięki uzyskanym

sekwencjom ustalono dokładniej pozycję taksonomiczną tych szczepów, a także dokonano oceny ich potencjału biotechnologicznego. W tym miejscu chciałbym zapytać, jakie warunki powinny zostać spełnione, aby izolaty te mogły uzyskać status nowego gatunku – jaka jest formalna ścieżka postępowania, prowadząca do nadania i uznania nowej nazwy gatunkowej? Wszystkie analizowane szczepy określono w rozprawie jako halofilne – czy jednoznacznie potwierdzono eksperymentalnie, że nie mają one właściwości halotolerantów?

Manuskrypt ostatniej włączonej do rozprawy pracy eksperymentalnej ("*Novel AMPs from saline environments - promising glimmer for inhibition of multidrug resistant E. faecalis and S. aureus infections?*") nie został jeszcze opublikowany – nie przeszedł zatem ostatecznej oceny edytorów i recenzentów. W jego pierwszej części opisano analizy sekwencji metagenomowych mikroorganizmów występujących w solankach (Kopalnia Bochnia) i tężniach solankowych w Łodzi, nakierowane na identyfikację nowych peptydów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Spośród wielu zidentyfikowanych kandydatów, do analiz eksperymentalnych wybrano trzy peptydy – dokonano ich syntezy, wykazano, że dwa z nich mają potencjał aplikacyjny oraz wykluczono ich cytotoksyczność względem komórek człowieka. Mam kilka uwag i pytań dotyczących tego manuskryptu: (1) w tytule należy unikać stosowania nieoczywistych skrótów – AMPs (ang. *antimicrobial peptides*); należy podawać pełne nazwy rodzajowe bakterii, w tym przypadku *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*; ponadto znak zapytania na końcu tytułu sugeruje, że autorzy poddają w wątpliwość aplikacyjny potencjał tych peptydów, (2) dlaczego nie wzięto pod uwagę genów peptydów zidentyfikowanych w sekwencjach metagenomowych i genomowych w trzech wspomnianych wcześniej, włączonych do rozprawy, artykułach, (3) prawidłowy zapis nazw szczepów drobnoustrojów patogennych, które wykorzystano do przeprowadzenia testów aktywności peptydów, powinien zawierać symbol kolekcji (ATCC); wskazane byłoby również zamieszczenie odniesień literaturowych dla poszczególnych mikroorganizmów, (4) doceniam przeprowadzenie w pracy dokowania molekularnego peptydów, jednak sugestie jakie wynikają z tych analiz powinny zostać zweryfikowane w toku analiz eksperymentalnych.

Przedstawione w recenzji drobne uwagi absolutnie nie wpływają na mój pozytywny odbiór i wysoką ocenę całości rozprawy. Uważam, że jest to bardzo wartościowe opracowanie, które przynosi wiele cennych danych i obserwacji na temat mikroorganizmów halofilnych i halotolerancyjnych występujących w solankach Pogórza Karpackiego. Podsumowując, do najważniejszych osiągnięć rozprawy zaliczam:

- określenie składu taksonomicznego mikrobiomu kopalni Bochnia z wykorzystaniem różnych podejść metodycznych oraz analizę stopnia zmienności mikrobiomów różnych stanowisk w czasie,
- uzyskanie kilkunastu złożonych genomów z metagenomów (MAGs; ang. *metagenome-assembled genomes*) pochodzących z niepoznanych wcześniej mikroorganizmów halofilnych,
- uzyskanie sekwencji genomów ośmiu szczepów halofilnych bakterii i archeonów, w większości reprezentujących nieopisane gatunki taksonomiczne,
- opracowanie i zdeponowanie uzyskanych sekwencji metagenomowych i genomowych w ogólnodostępnych bazach danych,

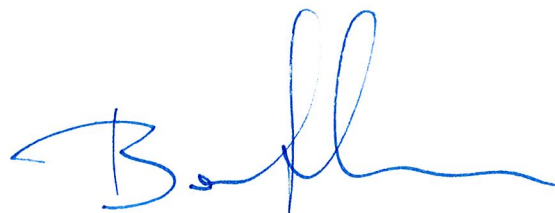
- identyfikację genów/zespołów genów potencjalnie zaangażowanych w syntezę produktów o biotechnologicznym potencjale,
- identyfikację i syntezę nowych peptydów przeciwdrobnoustrojowych i wykazanie ich specyficznego działania w układzie międzygatunkowym – wobec *E. faecalis* i *S. aureus*, a więc bakterii patogennych, które często wymykają się działaniu klasycznych terapii antybiotykowych.

W toku przeprowadzonych badań zrealizowano wszystkie postawione w rozprawie cele – ogólne i szczegółowe. Dowiedziono przy tym, że analizowane rodzime środowiska o charakterze endemicznym są bogatym rezerwuarem wielu nowych gatunków bakterii i archeonów, zasługują więc na głębsze zainteresowanie badaczy, zarówno ze względów poznawczych, jak i aplikacyjnych.

Wniosek końcowy

W mojej opinii, praca doktorska Pana mgr. Jakuba Lacha w pełni spełnia wymogi merytoryczne i redakcyjne stawiane rozprawom doktorskim, określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. (Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce). Prezentuje ona wysoki poziom naukowy i przynosi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jakim było zdefiniowanie i scharakteryzowanie mikrobiomów wybranych środowisk o wysokim zasoleniu w oparciu o dane genomyczne i metagenomiczne oraz ocena biotechnologicznego potencjału występujących tam drobnoustrojów. Rozwiązanie tego problemu wymagało od Doktoranta zarówno rozległej wiedzy z zakresu dyscypliny nauki biologiczne, jak i opanowania złożonego, specjalistycznego warsztatu badawczego.

Zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pana mgr. Jakuba Lacha do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Biorąc pod uwagę podkreśloną w recenzji wartość naukową uzyskanych wyników, kompleksowy wymiar przeprowadzonych badań o charakterze pionierskim (analiza środowisk słabo poznanych pod względem mikrobiologicznym), ich praktyczne efekty (identyfikacja i wykazanie przeciwbakteryjnego działania nowych peptydów, mogących stanowić alternatywę dla antybiotyków), wykorzystanie w badaniach zaawansowanych metod i narzędzi bioinformatycznych, a także opublikowanie większości wyników badań w międzynarodowych periodykach, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.



prof. dr hab. Dariusz Bartosik