



dr hab. Mikołaj Kokociński, prof. UAM
Zakład Hydrobiologii
Wydział Biologii UAM
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

Poznań, 21.05.2019

**Rezencja rozprawy doktorskiej
mgr Agnieszki Emilii Misztak zatytułowanej:
„Genomics, phenotypic characterisation and microbiome analysis of edible
cyanobacteria from *Arthrospira* genus” (Genomika, charakterystyka fenotypowa oraz
analiza mikrobiomu jadalnych cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira*).**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Misztak została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Małgorzaty Waleron specjalizującej się w badaniach molekularnych dotyczących cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira* oraz bakterii z rodzaju *Pectobacterium*. Badania te obejmują zarówno charakterystykę fenomiczną badanych szczepów jak i analizy filogenetyczne z wykorzystaniem różnych markerów genetycznych. Warto podkreślić ich aplikacyjny charakter związany z wykorzystaniem tych organizmów np. w przemyśle spożywczym. Temat rozprawy doktorskiej zatem bardzo dobrze wpisuje się w tematykę badań prowadzonych przez promotora rozprawy.

Celem pracy było dokładniejsze, interdyscyplinarne poznanie cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira*. Z tego względu główny cel pracy został podzielony na trzy odrębne cele obejmujące różne aspekty prowadzonych badań tj.:

- (i) charakterystyka genomu wybranych szczepów z rodzaju *Arthrospira*;
- (ii) określenie wpływu czynników stresogennych na przyrost biomasy *Arthrospira*
- (iii) poznanie mikrobiomu bakteryjnego powiązanego ze szczepami *Arthrospira*



Badania Doktorantki obejmują zatem bardzo szeroki zakres tematyczny zasługujący na duże uznanie. Choć cyjanobakterie z rodzaju *Arthrospira* są obiektem bardzo wielu doniesień naukowych (ok. 780 publikacji w bazie Scopus w ciągu ostatnich 5 lat) to przeważająca ilość publikacji dotyczy jednak poznania wpływu czynników środowiskowych na produkcję metabolitów bioaktywnych, ich właściwości i aktywności biologicznej lub warunków masowej, przemysłowej hodowli. W tym zakresie jedynie cel drugi postawiony w pracy wpisuje się w główny nurt badań. Pozostałe dwa cele w tym przede wszystkim zadanie dotyczące poznania mikrobiomu bakteryjnego należy natomiast do zagadnień wciąż bardzo mało poznanych a wręcz pionierskich. Dla potwierdzenia tej tezy przytoczę ponownie ilość prac w tej samej bazie Scopus wynoszącą 12 dla badań mikrobiomu. Tym samym podjęte badania w recenzowanej rozprawie doktorskiej mają szczególne znaczenie i nowatorski charakter.

Przedstawiona do oceny praca liczy 148 stron i ma prawidłowy układ, typowy dla publikacji naukowych z podziałem na wstęp, materiał i metody, wyniki, dyskusję oraz literaturę. Ostatnia część pracy stanowi 14 załączników przedstawiających szczegółowe wyniki. Duża część wyników została ponadto bogato zilustrowana i przedstawiona w rozprawie doktorskiej na 46 wykresach i w 19 tabelach. Praca zredagowana jest bardzo poprawnie, napisana w języku angielskim. Styl i gramatyka nie budzą zastrzeżeń, wskazując na bardzo dobrą znajomość języka angielskiego przez Doktorantkę i jej duży zasób specjalistycznych terminów naukowych.

We wstępie pracy Doktorantka wyczerpująco i kompetentnie przedstawia zagadnienia dotyczące cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira* obejmujące zarówno charakterystykę genomyczną, filogenezę jak i możliwości wykorzystania i zastosowania biomasy tych organizmów jako suplementów diety. Bardzo ważnym aspektem tej części wstępu jest omówienie wciąż obecnego problemu nazewnictwa i obowiązujących międzynarodowych kodeksów nomenklaturowych, według których opisywane i nadawane są nazwy taksonomiczne cyjanobakteriom. Szybki postęp i rozwój nowoczesnych metod analiz



molekularnych dostarcza coraz więcej danych przy równoczesnym braku jednoznacznego systemu pozwalającego klasyfikować i opisywać nowe taksony. Efektem tego mogą być mylne, nieprawidłowe opisy tak jak miało to miejsce w przypadku rodzaju *Spirulina*, która do dzisiaj jako nazwa komercyjna funkcjonuje w znacznie szerszym znaczeniu niż tylko taksonomicznym. Tym bardziej podkreślić należy, iż problem ten bardzo syntetycznie i umiejętnie został omówiony przez Doktorantkę. W drugiej części wstępu omówiony został natomiast wpływ między innymi temperatury, zasolenia oraz promieniowania gamma na przyrost biomasy różnych szczepów *Arthrospira* a także zawartości i udziału frakcji lipidowej w tej biomacie. Tak jak wspomniano wcześniej zagadnienia te z wyjątkiem wpływu promieniowania gamma są szeroko badane od wielu lat co odzwierciedla bogata literatura cytowana przez Doktorantkę.

Natomiast informacje na temat bakterii powiązanych z cyjanobakteriami uważam, że nie zostały w pełni omówione a przecież to zagadnienie jest trzecim celem pracy zawartym także w jej tytule. Krótki rozdział 3.1.9, którego brakuje w spisie treści tylko powierzchownie wprowadza w zagadnienia dotyczące współwystępowania z kulturami cyjanobakterii innych organizmów. Dodatkowo, zamieszczony krótki przegląd informacji dotyczy przede wszystkim bakterii, które mogą stanowić zagrożenie dla prowadzenia masowej hodowli *Arthrospira* lub doprowadzić do skażenia otrzymanej biomasy. Z najnowszych osiągnięć naukowych wynika natomiast, iż towarzyszący mikrobiom może istotnie wpływać na cyjanobakterie, z którymi współwystępują, na ich funkcjonowanie, biologię oraz produkcję metabolitów. Brak wprowadzenia i przeglądu literatury na ten temat jest tym bardziej zauważalny gdyż moim zdaniem ta część pracy jest nade wszystko nowatorska i wnosi znaczący wkład do nauki. Z treści dyskusji wnoszę jednak, iż Doktorantka wnikliwie zapoznała się z dotychczasowymi publikacjami w tym zakresie i zakładam, iż zostaną one zamieszczone we wstępie przyszłych doniesień naukowych. Prosiłbym jednak podczas obrony o przedstawienie istotnych założeń i/lub przesłanek naukowych, które skłoniły Doktorantkę do podjęcia badań nad mikrobiomem bakteryjnym.



W badaniach nad różnorodnością rodzaju *Arthrospira* Doktorantka wykorzystwała 8 genomów dostępnych w bazie danych GenBank oraz 5 genomów otrzymanych po przeprowadzeniu sekwencjonowania, złożenia i opisanie sekwencji genomów pięciu szczepów dostępnych w kolekcji kultur. Warto podkreślić, iż jedna z tych sekwencji pochodziła ze szczepu 09.13F wyizolowanego ze zbiornika wodnego zlokalizowanego na Syberii dzięki współpracy z Oleną Bazhenową z Uniwersytetu Rolniczego w Omsku. Także inne szczepy pochodzące np. z Kenii, Mozambiku czy Peru wykorzystane w tej pracy zostały wyizolowane z próbek środowiskowych we współdziałaniu z wieloma osobami z zagranicznych ośrodków naukowych co świadczy o szerokiej współpracy zagranicznej Doktorantki i zespołu, z którym pracowała. Bardzo pozytywnie oceniam zastosowanie wielu metod badawczych wpisujących się w tzw. polyphasic approach czyli podejście wielofazowe obejmujące charakterystykę fenomiczną, genetyczną, ultrastrukturalną jak i poznanie wymagań ekologicznych badanych cyjanobakterii. W każdej z tych faz badawczych można dalej zastosować różnorodne metody analityczne co też uczyniła Doktorantka. W recenzowanej pracy wykorzystano np. profile kwasów tłuszczowych jako markera chemotaksonomicznego do charakterystyki fenotypowej podczas gdy do charakterystyki genetycznej posłużono się analizą filogenetyczną z wykorzystaniem trzech markerów: 16S rRNA, ITS, i *cpeBA*-IGS jak i analizą filogenomiczną pozwalającą badać cały genom jak i pan-genom badanych szczepów. W przypadku analiz filogenomicznych zastosowane metody ANI i *isDDH* zgodne są z najnowszymi standardami przyjętymi w 2018 roku. Poprzez takie podejście Doktorantka mogła znacznie dokładniej poznać zróżnicowanie szczepów cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira* jak i wykazać, które z wybranych metod są najbardziej adekwatne przy opisie cyjanobakterii. Zastosowane metody zostały szczegółowo przedstawione na aż 23 stronach rozprawy doktorskiej co podkreśla wszechstronność badań ale także czasochłonność a tym samym ogromne zaangażowanie Doktorantki w projekt badawczy, który wykonała.

Uzyskanie wyniki analiz filogenetycznych potwierdziły, iż na podstawie sekwencji pojedynczych markerów rodzaj *Arthrospira* podzielony jest na 3 klady. Wykazano jednak

dodatkowo, iż horyzontalny transfer genów może wpływać na otrzymane wyniki w zależności od zastosowanego markeru tym samym podkreślając ograniczenia przy zastosowaniu tylko jednego z nich do opisu cyjanobakterii. Dowodem na to może także być poznanie nietypowej, mozaikowej struktury sekwencji ITS unikalnego szczepu z Syberii. Natomiast analiza filogenomiczna wykazała, iż badane szczepy z rodzaju *Arthrospira* można podzielić na dwa kłady, z których jeden odpowiada dwóm kładom (I + III) wyróżnionym na podstawie analizy sekwencji ITS. Analiza natomiast pan-genomu wykazała większe podobieństwo szczepów w obrębie kładów, niż pomiędzy nimi. W dyskusji Doktorantka wnioskuje iż zastosowanie analizy ANI i *isDDH* przyniosło dobre wyniki i są one mniej obciążone wpływem rekombinacji genów czy horyzontalnym transferem genów. Prosiłbym zatem Doktorantkę o komentarz czy uważa te analizy za mogące mieć szerokie zastosowanie w przyszłości przy opisie cyjanobakterii oraz jakie znaczenie mogą mieć badania pan-genomów w poznaniu innych grup cyjanobakterii np. z przytoczonych także w dyskusji z rodzaju *Raphidiopsis* czy *Microcystis*?. W samej dyskusji natomiast zabrakło mi podjęcia tematu związanego z pochodzeniem i ewolucją badanych szczepów *Arthrospira*. W trakcie obrony prosiłbym Doktorantkę o krótki komentarz czy uzyskane wyniki w tym sekwencje nowych szczepów potwierdzają sugerowany w literaturze odrębny ewolucyjny szlak rozwojowy wydzielonych klastrow w obrębie rodzaju *Arthrospira*?

Kolejnym etapem badań Doktorantki było poznanie możliwości wykorzystania kwasów tłuszczowych jako markera chemotaksonomicznego do identyfikacji na poziomie gatunku w obrębie rodzaju *Arthrospira* oraz zbadanie wpływu czynników stresogennych na przyrost biomasy poszczególnych szczepów. Otrzymane wyniki wykazały brak różnic w profilu tłuszczowym 15 zbadanych szczepów a tym samym nieprzydatność tego markera do uzupełnienia analiz filogenetycznych. Nie bardzo jednak rozumiem, dlaczego Doktorantka mimo podobnego składu kwasów tłuszczowych w każdym ze zbadanych szczepów uznała, iż profile te były specyficzne dla szczepów (ang. strain-specific) co według mnie wskazywałoby,



iz każdy ze szczepów posiadał odmienny skład tych związków. Bardzo proszę o wyjaśnienie jak Doktorantka rozumie pojęcie strain-specific w tym przypadku.

Natomiast specyficzne dla szczepów a więc strain-specific były odpowiedzi na czynniki stresogenne w tym na zmiany zasolenia, podczas gdy temperatura takich różnic nie wywoływała. Poza zasoleniem istotny negatywny wpływ na wzrost badanych szczepów miało także silne promieniowanie gamma oraz wysokie stężenia fungicydów. Najbardziej wrażliwym na zmiany zasolenia był szczep wyizolowany z Syberii a jednym z najbardziej odpornych był szczep z Namibii co może sugerować zależność zdolności adaptacyjnych od pochodzenia geograficznego szczepów. Ponadto wykazano, iż optimum termiczne nowego szczepu z Syberii jest znacznie niższe niż innych znanych szczepów *Arthrospira*. Wykazano jednakże, iż temperatura nie wpływa na zawartość kwasów tłuszczowych w tym szczepie podczas gdy zasolenie tak. Wyniki tych badań uważam za bardzo interesujące i niezwykle ważne gdyż mają także aplikacyjny charakter. Wskazują bowiem, iż wybór szczepu do komercyjnej hodowli powinien być uzależniony od jego zastosowania w praktyce tj. czy będzie on np. wykorzystywany w celach usuwania zanieczyszczeń z wody czy pozyskania cennych związków pokarmowych a także pokazują jak istotny jest wpływ warunków w jakich prowadzona jest hodowla.

Całość niezwykle obszernej i wieloaspektowej pracy dopełniają wyniki po raz pierwszy przeprowadzonych badań mikrobiomu bakteryjnego związanego z wyizolowanymi szczepami *Arthrospira* oraz występującego w próbkach ze świeżą, jak i liofilizowaną komercyjną biomasa. Wyniki te wykazały, iż skład mikroorganizmów towarzyszących badanym szczepom należy do czterech głównych grup tj. Proteobacteria, Terrabacteria, Bacteroides (FCB) i Verrucomicrobia (PVC) i jest zbliżony z taksonami zaobserwowanymi w naturalnym środowisku w ostatnim czasie. Sekwencjonowanie nowej generacji zostało potwierdzone jako skuteczna metoda do analiz mikrobiomu bakteryjnego. Za jej pomocą zaproponowano wyodrębnienie jednego z wyizolowanych szczepów bakterii jako nowego rodzaju i gatunku *Arthrospirobacter rubrum* gen. nov., sp. nov. Tym bardziej wyniki tej części pracy stanowią



bardzo cenne osiągnięcie naukowe. O dojrzałości naukowej Doktorantki świadczy świadomość, iż wyniki dotyczące powiązań mikrobiomu bakteryjnego ze szczepami cyjanobakterii to zaledwie początek poznawania tych zależności. Słusznie podkreślono, iż zależności te mogą mieć charakter powiązań metabolicznych. Dlatego chciałbym dopytać Doktorantkę czy zna prace, które by wskazywały na konkretne powiązania czy wpływ bakterii na produkcję metabolitów produkowanych przez cyanobacterie z rodzaju *Arthrospira* lub innych rodzajów cyjanobakterii np. powodujących zakwity w wodach śródlądowych.

Podsumowując pracę doktorską Pani mgr Agnieszki Misztak uważam, że Doktorantka podjęła się zbadania wielu interesujących problemów badawczych związanych z komercyjnie wykorzystywanymi cyjanobakteriami z rodzaju *Arthrospira*. Wykonując tak wieloaspektowy projekt Doktorantka opanowała wiele nowoczesnych technik badawczych a wyniki tych badań znacznie poszerzają naszą wiedzę na temat filogenezy, zmienności fenotypowej oraz towarzyszącego mikrobiomu bakteryjnego tych cyjanobakterii. Przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko. Dysertacja spełnia wymogi określone w Ustawie z 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym (tekst jednolity, Dz. U. 2014 poz. 1852). W związku z powyższym zwracam się z uprzejmą prośbą do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego (UG) i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUMed) o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Agnieszki Misztak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kolociński Młody