



Signed by /
Podpisano przez:

Adam Junka

Date / Data: 2026-
05-17 22:52

UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wydział Farmaceutyczny Zakład Technologii Translacyjnych

ul. Borowska 211, 50-556 Wrocław piętro I tel: (71)78-40-471 email: WF-30@umw.edu.pl
strona: pumadott.com

Wrocław 15.5.2026

Dr hab.n.med.Adam Junka, prof. UMW
Zakład Technologii Translacyjnych z
Pracownią Unikalnych Modeli Aplikacyjnych
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu
Recenzent rozprawy doktorskiej
zgodnie z pismem Przewodniczącego Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne
Politechniki Wrocławskiej dr hab.inż Roberta Góry, prof. uczelni
z dnia 19.03.2026

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Natalii Tyszkiewicz:

Analiza mikrobiomu anodowego i jego funkcjonalności w układach bioelektrochemicznych wykorzystywanych do biodegradacji zanieczyszczeń hydrofobowych oraz syntezy biosurfaktantów

Praca Pani mgr inż. Natalii Tyszkiewicz wpisuje się w aktualny i wciąż rozwijany nurt dotyczący nisko-kosztowej utylizacji produktów i odpadów przemysłowych; w swoich badaniach skupiła się min. na ocenie skuteczności wytworzonych mikrobiologicznych ogniwo paliwowych, analizie gatunkowej konsorcjów drobnoustrojów zasiedlających ich anody, zdolnością konsorcjów do biodegradacji zanieczyszczeń a także syntezy biosurfaktantów. Cele pracy badawczej postawione są zatem niezwykle szeroko i ambitnie, a Pani Doktorantka zmierzyła się z nimi w sposób zadawalający, zarówno w aspekcie koncepcji, przeprowadzonych badań z wykorzystaniem zróżnicowanej metodologii (począwszy od tradycyjnej mikrobiologii poprzez genetykę, analizy metaboliczne po pomiary elektryczne) oraz uzyskanych wyników; przedstawiony mi do recenzji manuskrypt w pełni spełnia zatem wymogi stawiane pracom doktorskim. Nie ma jednak prac w pełni doskonałych, zawsze

natomiast istnieje pole do ulepszenia określonych elementów dzieła oraz nauki. Poniższe uwagi, pytania oraz prośby o odniesienie się mają charakter życzliwy, jednakże proszę o ustosunkowanie się do tych, przy których jest to wprost wskazane. Pozostałe uwagi mają charakter rekomendacji.

Właściwą część pracy rozpoczyna 29-stronnicowy wstęp, który w mojej ocenie jest poprawny, i choć Autorka nie ustrzegła się błędów językowych i interpunkcyjnych, to ich liczba nie jest rażąca. Pozwolę sobie jednak zwrócić uwagę Pani doktorantki na fakt, że korzystnie jest tłumaczyć rzeczy nieoczywiste, natomiast rzeczy oczywiste pozostawić można inteligencji Czytelnika. Nie widzę wyraźnej potrzeby uzasadniania, że ogniwo dwukomorowe składa się z dwóch komór oraz że w komorze anodowej znajduje się anoda, a w komorze katodowej – katoda (strona 23 wstępu); lub że przykładem biosurfaktantu fosfolipidowego jest właśnie fosfolipid (str.40). Piszę o tym, ponieważ tego typu tautologii w całym manuskrypcie jest istotnie więcej, a pani Doktorantka, czy to pisząc w przyszłości raporty, czy publikacje powinna w pełni panować nad przekazywaną informacją. Niestety, w określonych przypadkach, stosowanie zbyt wielokrotnie złożonych zdań - prawdopodobnie powodowane chęcią dogłębnego wytłumaczenia zagadnienia - prowadzi do błędów merytorycznych; przykładem może być stwierdzenie że *P.aeruginosa* jest „mikroorganizmem planktonicznym” (strona 31 wstępu). Rozumiem że Pani doktorantka chciała napisać, że „sub-populacja komórek *P.aeruginosa*, nieprzylegająca w ogniwie do anody przekazuje elektrony w sposób pośredni za pomocą mediatorów egzogennych”. Pozwolę sobie również zwrócić uwagę na przejawiające się we wstępie skróty myślowe pokroju „biofilm 3D” albo „bakterie rosnące na toluenie” i inne; w miejscu których oczekiwałbym jednak sformułowań pokroju „różnicowana topologicznie struktura biofilmu” czy „bakterie rosnące w roztworze/zawiesinie zawierającej toluen”, zgodnie z zasadami pisania tekstów naukowych.

Cel i zakres pracy przedstawione są w sposób czytelny i prawidłowy.

Materiały i metody przedstawione są w sposób oszczędny, co wynika z faktu opisanie istotnej ich części w sposób szczegółowy w publikacjach wymienionych w spisie dorobku naukowego rozpoczynającego się na stronie 156.

Pragnę natomiast, by Pani doktorantka odniosła się do następujących wyników oraz dotyczącej tych wyników dyskusji przedstawionych w pracy:

Pytanie 1: „4.1.3. analiza metabolitów metodą NMR” przedstawiona w Tabeli 5 wskazuje zidentyfikowane metabolity w anolicie zasilanym glukozą (grupa A) oraz glukozą i benzenem (grupa). Interesująca jest obecność dimetyloaminy wyłącznie w wariancie doświadczenia obejmującym jednoczesne zastosowanie glukozy i benzenu, przy jej braku w układzie

zawierającym samą glukozę. Obserwacja ta wymaga głębszego omówienia, o co poproszę Doktorantkę. W szczególności należałoby rozważyć, czy obecność benzenu mogła:

- po pierwsze, zmienić skład lub aktywność konsorcjum mikroorganizmów tworzących biofilm anodowy;
- po drugie, nasilić stres komórkowy, uszkodzenia osłon komórkowych lub „turnover” biomasy, prowadząc do wtórnego uwalniania i metabolizowania związków azotowych;
- po trzecie, pośrednio uruchomić metabolizm metylowanych związków azotowych obecnych w pożywce, inokulum (otoczki bakteryjne, błony) lub macierzy biofilmu, takich jak cholina, betaina, trimetyloamina lub inne aminy czwartorzędowe.

Zasadne byłoby także, aby Autorka wskazała, która z tych interpretacji wydaje się jej najbardziej prawdopodobna oraz odniosła się w niej do obecności dimetyloaminy jedynie w układzie zawierającym glukozę a nie glukozę i benzen.

Autorka wskazuje również, opisując wyniki przedstawione w Tabeli 5, że obecność mrówczanu, octanu lub etanolu jest efektem rozszczepienia pierścienia aromatycznego benzenu i powstania pirogronianu. Poproszę zatem Panią doktorantkę o ustosunkowanie się do alternatywnej hipotezy, zgodnie z którą obecność mrówczanu, ale także maślanu, propionianu czy bursztynianu jest typową manifestacją obecności dojrzałego biofilmu, w którym komórki go tworzące rozwijają się w warunkach hipoksji, szczególnie w obecności łatwo przyswajalnego monosacharydu jakim jest glukoza, co zresztą w roku 2017 wykazał Promotor doktorantki wraz z zespołem (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.01.018>). Jakie będą konsekwencje takiego stanu rzeczy dla omawianych analiz?

Pytanie 2: następnie proszę Panią Doktorantkę o odniesienie się do wyników przedstawionych na mapie cieplnej na Rysunku 17. Z przedstawionych danych wynika, że inkubacja drobnoustrojów w ogniwie prowadziła do wyraźnej dominacji jednego taksonu, osiągającego średnio około 40–80% względnego udziału, podczas gdy pozostałe identyfikowane taksony występowały zwykle na poziomie kilku procent. W grupie A (1–5) dominował rodzaj *Aeromonas*, natomiast w grupie B (1–5) rodzaj *Citrobacter*. W związku z tym proszę o przedyskutowanie, czy przy zastosowanej metodzie identyfikacji, opartej na analizie DNA, a nie RNA lub innych markerów aktywności metabolicznej, część sygnału pochodzącego od taksonów obecnych na niskim poziomie względnego udziału mogła odpowiadać DNA komórek martwych, uszkodzonych lub DNA wbudowanemu w macierz biofilmu. W takim ujęciu należałoby rozważyć, czy rzeczywisty udział funkcjonalny tych mniej licznych taksonów w generowaniu efektów elektrochemicznych był ograniczony.

Zasadne byłoby również, aby Doktorantka odniosła się do pytania, czy obserwowane efekty elektryczne mogły być w głównej mierze związane z aktywnością dominujących rodzajów, tj. *Aeromonas* w grupie A oraz *Citrobacter* w grupie B, czy też istnieją przesłanki wskazujące na istotny udział mniej licznych członków konsorcjum. Szczególnie pomocne byłoby wskazanie, jakie dodatkowe analizy, na przykład RNA-seq, RT-qPCR, detekcja kolorymetryczna poziomu żywotności, analiza eDNA lub korelacja udziału poszczególnych taksonów z parametrami elektrochemicznymi, pozwoliłyby lepiej rozróżnić obecność taksonomiczną od rzeczywistej aktywności funkcjonalnej biofilmu anodowego.

Pytanie 3: Poproszę Panią Doktorantkę o krytyczne odniesienie się do wniosku ze strony 79, zgodnie z którym uproszczenie struktury biofilmu i dominacja wybranych taksonów miałyby sugerować powstanie wydajnej sieci metabolicznej wspomagającej rozkład zanieczyszczeń do związków łatwiej przyswajalnych przez egzoelektrogenerny. Proszę rozważyć, czy tych samych wyników nie można interpretować prościej: jako konsekwencji niedostosowania większości bakterii pochodzących z inokulum glebowego do warunków pokarmowych panujących w ogniwie. Jeżeli w układzie dostępne były jedynie ograniczone i specyficzne źródła węgla oraz energii, to dominacja jednego taksonu na poziomie 50–80% mogła wynikać przede wszystkim z jego zdolności do wykorzystania dostępnego substratu, podczas gdy pozostałe bakterie mogły zostać zahamowane wzrostowo, pozostawać w stanie niskiej aktywności metabolicznej lub stopniowo obumierać. W takim ujęciu niski względny udział pozostałych taksonów nie musi świadczyć o ich udziale w funkcjonalnej sieci metabolicznej. Może raczej odzwierciedlać resztkową obecność komórek lub ich DNA pochodzącego z pierwotnego inokulum, bez istotnego znaczenia dla pracy ogniwa. Proszę zatem wskazać, jakie dane uzyskane w pracy przemawiają za hipotezą współpracy metabolicznej między taksonami, a jakie mogłyby wspierać wyjaśnienie oparte na prostej selekcji troficznej, czyli przeżyciu i namnażaniu głównie tych bakterii, które były w stanie korzystać z dostępnego medium. Jakże dodatkowe analizy pozwoliłyby rozróżnić te dwa scenariusze, na przykład ocena żywotności komórek, analiza RNA zamiast DNA, oznaczenie eDNA w macierzy biofilmu, pomiary zużycia substratów lub doświadczenia porównujące wzrost dominujących taksonów w zastosowanym medium?

Pytanie 4: Proszę Panią Doktorantkę o odniesienie się do interpretacji wyników dotyczących genów związanych z degradacją węglowodorów alifatycznych, w szczególności genu *ladA* (Rysunek 40, Heat-mapa). Z przedstawionych danych wynika, że gen ten był wykrywany w różnych wariantach ogniw i próbkach środowiskowych. Ponieważ jednak analiza opierała się na detekcji DNA, a nie RNA, białka lub aktywności enzymatycznej, proszę o wyjaśnienie, w

jakim stopniu obecność genu *ladA* można traktować jako dowód aktywnego udziału bakterii w degradacji alkanów w warunkach ogniwa, a w jakim jedynie jako informację o potencjale genetycznym obecnym w inokulum glebowym. Zasadne byłoby również przedyskutowanie, czy *ladA* nie może być genem stosunkowo szeroko rozpowszechnionym w bakteriach środowiskowych zdolnych do metabolizowania węglowodorów, a więc czy jego obecność w próbkach z różnych miejsc nie odzwierciedla raczej ogólnego potencjału degradacyjnego mikrobioty glebowej niż specyficznej aktywacji tego szlaku w ogniwie. Innymi słowy, proszę wskazać, jakie dane przemawiają za tym, że gen *ladA* był funkcjonalnie istotny w badanym układzie, a nie stanowił jedynie śladu obecności DNA bakterii wprowadzonych wraz z inokulum.

Pytanie nr 5: Poproszę Panią Doktorantkę o krytyczne odniesienie się do interpretacji mikrofotografii SEM przedstawionych na Rysunku 54, w szczególności do opisu struktur wskazanych jako „krople substratu ropy naftowej” oraz „przewodzące nanowłókna białkowe egzoelektrogenów”. Obrazy SEM są wartościowe jako dokumentacja morfologii biofilmu anodowego, jednak ich interpretacja funkcjonalna i chemiczna wymaga dużej ostrożności. W związku z tym proszę o odniesienie się do następujących kwestii:

- a) identyfikacja „kropli substratu”: na jakiej podstawie Autorka uznała widoczne struktury za krople substratu, a nie za elementy macierzy biofilmowej, wysuszony materiał organiczny, artefakty przygotowania próbki lub pozostałości medium? Sama morfologia obserwowana w SEM nie pozwala jednoznacznie określić składu chemicznego takich struktur.
- b) wpływ przygotowania próbki do SEM: proszę wyjaśnić, jak Autorka interpretuje obecność struktur opisanych jako krople w kontekście procedury przygotowania próbki do SEM, która zwykle obejmuje utrwalanie, odwodnienie, suszenie oraz obrazowanie w warunkach próżni. Czy w takich warunkach rzeczywiście można oczekiwać zachowania kropli lotnego lub hydrofobowego substratu?
- c) interpretacja struktur włóknistych: analogicznie proszę o doprecyzowanie, na jakiej podstawie struktury włókniste zostały uznane za „przewodzące nanowłókna białkowe egzoelektrogenów”. SEM pozwala ocenić morfologię, ale nie rozstrzyga jednoznacznie ani charakteru białkowego tych struktur, ani ich przewodnictwa, ani udziału w bezpośrednim transferze elektronów. Mogą to być pili, elementy EPS, wysuszony materiał macierzy biofilmowej.

Pragnę zaznaczyć, że przedstawione powyżej pytania i uwagi nie podważają mojej pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Natalii Tyszkiewicz. Ich celem jest przede wszystkim doprecyzowanie wybranych interpretacji, pogłębienie dyskusji naukowej oraz wskazanie elementów, których rozwinięcie może przyczynić się do dalszego podniesienia jakości warsztatu badawczego i publikacyjnego Doktorantki. Uważam, że rozprawa dotyczy aktualnego i ważnego problemu naukowego, została oparta na szerokim materiale eksperymentalnym oraz dokumentuje zdolność Autorki do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W mojej ocenie rozprawa doktorska pt. *„Analiza mikrobiomu anodowego i jego funkcjonalności w układach bioelektrochemicznych wykorzystywanych do biodegradacji zanieczyszczeń hydrofobowych oraz syntezy biosurfaktantów”* spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, zgodnie z którym rozprawa doktorska powinna prezentować ogólną wiedzę teoretyczną kandydata, umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie Pani mgr inż. Natalii Tyszkiewicz do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora, w tym do publicznej obrony rozprawy doktorskiej, a mając na względzie wysoką interdyscyplinarność przeprowadzonych danych wnoszę również o wyróżnienie recenzowanej pracy doktorskiej.



Signed by /
Podpisano przez:

Adam Junka

Date / Data: 2026-
05-17 22:53