



IO PAN SOPOT

01-08-2022

Poznań, 28.07.2022

L.dz. 360

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

**Rezencja rozprawy doktorskiej mgr Marty Cegłowskiej zatytułowanej:  
„Wybrane Bałtyckie cyjanobakterie jako potencjalne źródło związków biologicznie  
aktywnych” (Selected Baltic Cyanobacteria as a potential source of biologically active  
compounds).**

**1. Ocena wstępna rozprawy doktorskiej**

Przedmiotem recenzji jest rozprawa doktorska Pani mgr Marty Cegłowskiej, która została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Alicji Kosakowskiej. Obiektem badań były dwa szczepy cyjanobakterii tj. *Pseudanabaena galeata* CCNP1313 oraz *Limnoraphis sp.* CCNP1324. W pracy dokonano wieloaspektowej charakterystyki ww. szczepów oraz wykazano ich zdolność do produkcji wybranych cyjanometabolitów. Rozpoznano także strukturę oraz aktywność biologiczną tych związków poprzez zastosowanie różnorodnych analiz i biotestów. Temat rozprawy doktorskiej zatem wpisuje się w ważną tematykę badań z zakresu biologii i toksyczności cyjanobakterii mogących stanowić z jednej strony poważne zagrożenie dla zdrowia i życia ludzi jak i zwierząt a z drugiej strony być źródłem wielu cennych związków chemicznych. Analizowane taksony cyjanobakterii są mało rozpoznane i nie były dotąd tak wnikliwie badane co stanowi o szczególnym znaczeniu badań zrealizowanych przez Doktorantkę. Podjęte w pracy zagadnienia stanowią o jej nowatorskim charakterze a sama praca ma charakter pionierski i otwiera szerokie perspektywy dalszych interesujących badań.

**2. Merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej**

Głównym celem pracy było poszerzenie wiedzy na temat dwóch szczepów bałtyckich cyjanobakterii a także zbadanie różnorodności produkowanych przez te organizmy

metabolitów. W pracy postawiono trzy hipotezy badawcze, z których druga i trzecia wydają się częściowo powtarzać dotycząc nieodkrytego bogactwa morza w postaci nierozpoznanych związków biologicznie aktywnych.

Dotychczasowa wiedza na temat cyjanobakterii z tego akwenu dotyczy przede wszystkim dość dobrze poznanych taksonów powodujących zakwity a przy tym zdolnych do produkcji szeroko opisywanych cyjanotoksyn. Natomiast niewiele jest doniesień naukowych na temat cyjanobakterii z rodzaju *Pseudanabaena* i *Limnoraphis*. Pod tym względem wybrany przedmiot badań wraz z jego wieloaspektową charakterystyką stanowi nowe, oryginalne ujęcie.

Główny cel badań został w pełni osiągnięty poprzez konsekwentną realizację celów i zadań częściowych. Składały się na nie kolejne etapy tj. identyfikacja za pomocą analiz molekularnych oraz charakterystyka badanych szczepów zarówno pod względem budowy morfologicznej, struktur komórkowych oraz zawartości pigmentów. Następnie Doktorantka wykazała zdolność badanych cyjanobakterii do produkcji różnorodnych związków chemicznych oraz oceniła ich aktywność biologiczną. Na tym etapie Doktorantka wykazała się dużą znajomością dostępnych analiz chemicznych oraz biotestów. Zastosowała prawidłowe, nowoczesne metody analityczne w tym między innymi szerokie spektrum analiz z zastosowaniem chromatografu cieczowego sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas. Większość analiz Doktorantka wykonała sama lub pod opieką doświadczonych ekspertów. Potwierdza to jej zdolność do pracy w wieloosobowym zespole badawczym i solidne doświadczenie laboratoryjne. Na podkreślenie zasługuje duży nakład pracy związany z przeprowadzonymi analizami.

Wyniki badań zostały opublikowane w czterech, wieloautorskich artykułach w czasopismach znajdujących się na liście JCR tj. *Algal Research* (2020), *Toxins* (2022) oraz *Marine Drugs* (2020, 2022). Artykuły te składają się na cykl rozprawy doktorskiej. Doktorantka w każdym z nich jest pierwszym autorem z wiodącym jak wynika z załączonych oświadczeń udziałem polegającym na zaplanowaniu koncepcji badań, wykonaniu lub udziale w analizach

laboratoryjnych, opracowywaniu czy modyfikacji zastosowanych metod oraz pisaniu manuskryptów. Tematyka badawcza w pełni pasuje do profilu tych czasopism co tym samym zwiększa szanse na dotarcie do szerokiego grona międzynarodowych odbiorców. Mimo bardzo krótkiego czasu od ukazania się tych artykułów dwa z nich są już wielokrotnie cytowane co potwierdza ich duży potencjał w poszerzaniu wiedzy na temat bałtyckich cyjanobakterii.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska opisująca syntetycznie opublikowane osiągnięcia posiada prawidłowy układ, na który składa się wstęp z zdefiniowanym celem badań, opis materiału i metod badawczych, wyniki oraz wnioski. Wstęp i metody badań pozwalają bardzo precyzyjnie zapoznać się z podjętą tematyką i zastosowanymi metodami badawczymi, które nie budzą żadnych zastrzeżeń. Wyniki zostały przedstawione w uporządkowany sposób, bogato zilustrowane oraz udokumentowane licznymi tabelami i rycinami przedstawiającymi struktury chemiczne i widma fragmentacyjne związków chemicznych, drzewa filogenetyczne a także zdjęcia badanych szczepów wykonane pod mikroskopem transmisyjnym. Literatura obejmuje bogaty przegląd doniesień naukowych w tym wiele bieżących pozycji.

Do najważniejszych osiągnięć naukowych pierwszej publikacji należy dokładne scharakteryzowanie szczepu z rodzaju *P. galeata* CCNP1313 wyizolowanego z Zatoki Gdańskiej w 2010 roku przez dr Justynę Kobos i zdeponowanego w Kolekcji Kultur Północnej Polski w Zakładzie Biotechnologii Morskiej UG. Dotychczasowe badania molekularne oparte o analizę sekwencji 16S rDNA czy ITS nie pozwoliły na jednoznaczną identyfikację taksonomiczną badanego szczepu i zakwalifikowanie do jednego ze znanych 50 gatunków z rodzaju *Pseudanabaena*. Dopiero zastosowana przez Doktorantkę analiza mniej konserwatywnego fragmentu RbcLX umożliwiła jednoznaczne wyodrębnienie badanego szczepu od rodzaju *Limnothrix* a uzupełniona przez analizy ultrastruktur komórkowych z zastosowaniem TEM na zaklasyfikowanie badanego szczepu jako *Pseudanabaena galeata*. Tym samym Doktorantka potwierdziła jak ważne jest wieloaspektowe podejście (polyphasic approach) w badaniach taksonomicznych cyjanobakterii. W tym miejscu chciałbym zapytać

doktorantkę o wymagania środowiskowe tego gatunku, czy znane są np. optymalne warunki do rozwoju tej cyjanobakterii oraz jaki jest jej udział w zbiorowiskach fitoplanktonu Zatoki Gdańskiej. W tej samej publikacji Doktorantka przedstawiła także po raz pierwszy dla szczepu *P. galeata* CCNP1313 szeroką charakterystykę zawartości barwników fotosyntetycznych i pomocniczych w różnych warunkach świetlnych oraz wykazała jego zdolność do produkcji ponad 26 nieznanymi peptydów. Nie wykazano natomiast zdolności tego szczepu do produkcji często stwierdzanych w ekosystemach wodnych cyjanotoksyn takich jak mikrocystyna, saksitoksyna czy anatoksyna. Zastanawiam się czy jest to typowe dla cyjanobakterii z tego rodzaju czy tylko dotyczy badanego szczepu – proszę o odpowiedź.

W drugiej publikacji Doktorantka wraz z współautorami wykazała zdolność szczepu *P. galeata* CCNP1313 do produkcji wielu następnymi, nowych metabolitów oraz oceniła ich aktywność biologiczną. Opisane zostały kolejne związki peptydowe nieznanymi dotąd z literatury. Spośród 45 dotąd nieopisanych peptydów scharakteryzowano strukturę czternastu z nich. Zostały one zgrupowane w dwóch grupach związków nazwanych przez Autorkę jako galeapeptyny (GP) oraz Pseudanabaena galeata peptydy (PG). Ponadto poprzez zastosowanie szeregu analiz i biotestów podzielono te związki wg. aktywności biologicznej. Do bardzo ciekawych i ważnych z punktu medycznego osiągnięć tej pracy zaliczyłbym wykazanie cytotoksyczności metabolitów syntetyzowanych przez szczep *P. galeata* CCNP1313 wobec gruczołaka piersi (T47D) oraz ludzkich komórek tkanki łącznej (HDF). Metabolity te zostały zidentyfikowane jako peptydy. Ponadto bardzo istotnym wnioskiem badań było stwierdzenie obecności mieszaniny tych związków w testowanych frakcjach chromatograficznych, które mogą wchodzić ze sobą we wzajemne interakcje. Znaczącym osiągnięciem pracy było stwierdzenie właściwości antywirusowych surowych ekstraktów otrzymanych ze szczepu *P. galeata* CCNP1313 jak i zidentyfikowanych metabolitów względem wirusa Zachodniego Nilu, wirusa ostrej niewydolności oddechowej oraz ludzkiego koronawirusa OC43. Prosiłbym o odpowiedź czy Doktorantka zna przykłady wykorzystania produkowanych przez cyjanobakterie metabolitów w produkcji leków czy szczepionek?

W artykule trzecim i czwartym natomiast Doktorantka przedstawiła charakterystykę chemotypową szczepu *Limnoraphis* sp. CCNP1324 wyizolowanego z Zatoki Puckiej i pozyskanego także z Kolekcji Kultur Północnej Polski. Zabrakło mi jednak informacji dlaczego szczep ten początkowo zaklasyfikowany jako *Lyngbya aestuarii* nie został scharakteryzowany w podobny sposób jak szczep *P. galeata* tj. za pomocą rozszerzonych badań molekularnych? Podobnie jak w przypadku szczepu *P. galeata* chciałbym zapytać o jego wymagania środowiskowe i czy często obserwowany jest w fitoplanktonie Zatoki Gdańskiej i Zatoki Puckiej.

Efektom badań na tym szczepie było poznanie 18 nowych analogów związków z klasy aeruginozamidów (AEG) należących do cyjanobaktyn. Jest to duża, zróżnicowana strukturalnie grupa związków wykrywana u odległych taksonomicznie cyjanobakterii. Do ważnych osiągnięć autorki należy opisanie nowej modyfikacji strukturalnej cyjanobaktyn. Dodatkowo autorka wykazała, iż wybrane zidentyfikowane aeruginozamidy posiadają cytotoksyczne właściwości względem gruczołaka piersi podobnie jak wcześniej opisane metabolity produkowane przez szczep *P. galeata*. Do ważnych obserwacji należy zaliczyć hamujące działanie produkowanych przez *Limnoraphis* sp. CCNP1324 metabolitów względem ludzkiego cytochromu P450 oraz promujące generowanie stresu oksydacyjnego. Zaznaczyć jednak należy, iż tylko wybrane aeruginozamidy i tylko przy najwyższym stężeniu wywoływały te efekty. Tym samym wykazano, iż grupa tych związków jest bardzo złożona i składa się z różniących się strukturalnie a przez to także wykazujących się różną aktywnością biologiczną wariantów.

Dokonania Doktorantki pozwoliły zatem na pierwszą tak kompleksową charakterystykę dwóch mało znanych taksonów cyjanobakterii. Badania te znacząco poszerzają wiedzę nie tylko na temat flory cyjanobakterii Morza Bałtyckiego na poziomie różnorodności gatunkowej ale także na poziomie różnorodności chemotypowej. Warto podkreślić aspekt aplikacyjny tych badań gdyż markery chemotaksonomiczne pozwalają na oszacowanie zmienności na poziomie wewnątrzgatunkowym w obrębie populacji jednego gatunku. Pełne jej poznanie może być



niezwykle istotne przy ocenie potencjalnych zagrożeń środowiskowych. Prosiłbym Doktorantkę o opinię na temat możliwości zastosowania wiedzy o markerach chemotaksonomicznych w monitoringu środowiskowym. Do bardzo ważnych zaliczyłbym także wyniki ukazujące badane szczepy cyjanobakterii jako bogate źródło związków o dużym potencjale farmakologicznym. Wyniki Doktorantki są niewątpliwie wierzchołkiem góry lodowej odkryć naukowych dotyczących różnorodności cyjanobakterii i produkowanych przez nie cennych związków chemicznych

### 3. Ocena końcowa

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej mgr Marty Cegłowskiej uważam, że Doktorantka podjęła się zbadania bardzo istotnego tematu badawczego związanego z charakterystyką wciąż mało poznanych taksonów cyjanobakterii w ważnym kontekście jako potencjalnego źródła różnorodnych metabolitów. Dzięki wieloaspektowemu podejściu oraz zastosowaniu nowoczesnych technik badawczych praca doktorska wnosi istotny dorobek do rozwoju współczesnej biologii i ekologii sinic poszerzając zarazem naszą wiedzę na temat „ukrytego bogactwa Morza Bałtyckiego”.

Przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską oceniam zatem bardzo wysoko. Dysertacja spełnia wymogi określone w określone w art.13 ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 poz. 1789 z późn. Zm.). W związku z powyższym zwracam się z uprzejmą prośbą do Rady Naukowej Instytutu Oceanologii Polskiej Akademii Nauk w Sopocie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Marty Cegłowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Marty Cegłowskiej.

*Mikołaj Kokociński*

dr hab. Mikołaj Kokociński prof. UAM