

Łódź, dn. 06.03.2018 r.

dr hab. inż. Małgorzata Piotrowska
Politechnika Łódzka
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii
ul. Wólczańska 171/173
90-924 Łódź

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Jacka Panka

pt: „Opracowanie metod detekcji grzybów termoopornych z gatunku *Talaromyces flavus*
na podstawie technik PCR, real-time PCR oraz LAMP”

promotor rozprawy: **prof. dr hab. Magdalena Frąc**

Podstawą formalną wykonania recenzji jest Uchwała Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN w Lublinie z dnia 19.01.2018 roku oraz pismo z dnia 22.01.2018 roku.

Znaczenie podjętej tematyki badawczej

Zanieczyszczenie produktów spożywczych przez grzyby pleśniowe stanowi poważne zagrożenie dla ich jakości i bezpieczeństwa. W produktach poddawanych obróbce termicznej, pasteryzacji, mogą rozwijać się grzyby termooporne. Izolowane są zwykle z produktów owocowo-warzywnych, takich jak soki, dżemy, jak również z napojów izotonicznych nie zawierających konserwantów.

Do grzybów termoopornych należą gatunki z rodzaju *Byssochlamys*, *Neosartorya* i *Talaromyces*, będące teleomorficznymi formami grzybów, odpowiednio, z rodzaju *Paecilomyces*, *Aspergillus* i *Penicillium*. Ich termoporność jest uwarunkowana tworzeniem askospor, które mogą przetrwać 30 minutowe ogrzewanie w temperaturze 75°C lub wyższej. Grzyby te nie tylko powodują psucie żywności na skutek rozkładu, np. pektyn, ale też ze względu na możliwość tworzenia mykotoksyn stanowią zagrożenie dla zdrowia konsumentów. Ponadto powodują straty ekonomiczne i utratę marki producentów. W związku z tym bardzo ważne, z punktu widzenia producentów żywności, jest opracowanie i wdrożenie do rutynowych działań, metod oznaczania obecności tych grzybów w surowcach i w produktach finalnych.

Z powyższych względów uważam, iż **temat rozprawy został wybrany właściwie, jest w pełni aktualny i wychodzi naprzeciw potrzebom producentów żywności**, a co za tym idzie opracowane metody detekcji grzybów termoopornych z gatunku *Talaromyces flavus* mają dużą szansę na wprowadzenie do praktyki przemysłowej.

Ogólna charakterystyka rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska liczy 114 stron i ma układ typowy dla tego rodzaju prac eksperymentalnych. Rozprawa rozpoczyna się streszczeniem (w języku polskim i angielskim), po czym następuje wstęp liczący dwie strony, przybliżający zagadnienie zanieczyszczenia żywności przez grzyby termooporne, ze szczególnym uwzględnieniem *Talaromyces flavus*. Ten krótki wstęp można uznać za genezę pracy, podkreślony jest fakt konieczności poszukiwania metod szybkiej detekcji tych organizmów. Kolejny, obszerny rozdział zawarty na 27 stronach przedstawia aktualny stan wiedzy w przedmiocie rozprawy. W dalszej kolejności Doktorant zamieścił cel pracy, opis materiałów i metod (20 stron), a następnie wyniki z ich omówieniem (23 strony). Dziesięć wniosków sformułowanych na podstawie badań poprzedzonych zostało pięciostronicową dyskusją wyników. Odrębnym rozdziałem jest protokół izolacji DNA będący efektem prowadzonych badań. Rozprawa kończy się spisem literatury, zawartym na 22 stronach i obejmującym 203 pozycje bibliograficzne, związane z tematem i zakresem pracy, z czego 36% pochodzi z ostatnich 10 lat. Praca ilustrowana jest 37 rysunkami oraz zawiera 14 tabel w części metodycznej pracy. Ich spisy stanowią dodatkowe podrozdziały.

Szczegółowa ocena rozprawy doktorskiej

Pierwszy rozdział **części teoretycznej rozprawy** wprowadza czytelnika w tematykę badań i przedstawia aktualny stan wiedzy i jest generalnie podzielony na dwie części: pierwsza z nich, którą można nazwać mikrobiologiczną, opisuje mikroorganizm będący przedmiotem pracy pod kątem morfologii, właściwości fizjologicznych i biochemicznych. W drugiej części zaprezentowane zostały metody, które są stosowane w detekcji grzybów termoopornych, klasyczne-hodowlane i metody oparte na technikach biologii molekularnej (PCR, real-time PCR i LAMP), łącznie z metodami izolacji i sekwencjonowania DNA.

W pierwszym podrozdziale Doktorant scharakteryzował *Talaromyces flavus* pod względem cech morfologicznych, wyglądu kolonii, kształtu i rozmiarów konidiów, askospor, worków z zarodnikami, itp., co zostało zilustrowane rysunkami 1-4, jednak uważam, że tylko rysunek 3 można tak nazwać, pozostałe to fotografie. Nie wszystkie z nich są odpowiedniej jakości i wymagałyby uzupełnienia: np. rysunek 1 – nie zaznaczono, które fotografie odpowiadają wymienionym gatunkom; rysunek 2 – zdjęcia obrazów mikroskopowych wymagają zamieszczenia skali pozwalającej określić wymiary poszczególnych elementów, ponadto w tekście fotografia ta jest cytowana jako ilustrująca morfologię askospor, zaś widoczne są jedynie konidiofory.

W następnej kolejności zdefiniowane zostało pojęcie termooporności grzybów pleśniowych. Miarą termooporności mikroorganizmów jest tzw. czas dziesięciokrotnej

redukcji D w określonej temperaturze, stąd określenie charakteryzujące *T.flavus*: „...jest zdolny do przetrwania ogrzewania do temperatury...” jest nieprecyzyjne. Czy znane są wartości D dla tego gatunku?

Bardzo dobrze w tym rozdziale zostały przybliżone mechanizmy odpowiedzialne za termooporność pleśni, takie jak akumulacja mannitolu, trehalozy czy oligosacharydów przez grzyby termooporne. Jednak, co podkreślono, nie został w literaturze jednoznacznie wskazany ten mechanizm.

Kolejny podrozdział dotyczy metabolitów wtórnych wytwarzanych przez *Talaromyces flavus*. Doktorant zaklasyfikował do grupy metabolitów również enzymy, co według mnie jest niewłaściwe. Mam wątpliwości co do umieszczenia wśród mykotoksyn alternariolu, który jest toksyną wytwarzaną przez grzyby z rodzaju *Alternaria*. Doktorant cytuje trzy publikacje, jednak w żadnej z nich nie wykazano tworzenia tego metabolitu. Według mnie opisana dalej tematyka wykorzystania *Talaromyces flavus* jako organizmu stosowanego w biologicznej ochronie roślin (str. 17) za bardzo została rozbudowana w stosunku do podrozdziałów dotyczących bezpośrednio fizjologii *T.flavus* i zagrożeń wynikających z zanieczyszczenia żywności przez ten organizm.

Jako mikrobiolog odczuwam pewien niedosyt związany z dość ogólnym potraktowaniem zagadnień mikrobiologicznych w części teoretycznej pracy. Doktorant zrekompensował to bardzo szczegółowym podejściem do drugiej części dotyczącej technik biologii molekularnej, które, co wyraźnie widać, są Mu bliższe.

Kolejny rozdział rozpoczyna się wprowadzeniem w metody detekcji grzybów termoopornych. Przedstawione zostały wady metod klasycznych, hodowlanych – długi czas oczekiwania na wynik i niska specyficzność identyfikacji. Jednak opis „konwencjonalne metody detekcji” jest niejednoznaczny, proszę o wyjaśnienie co Doktorant rozumie pod pojęciem „detekcja” w tym konkretnym przypadku metody hodowlanej - czy metody oznaczania obecności tych grzybów, metody ich izolacji, czy metody ich identyfikacji.

Następne rozdziały dotyczą głównego nurtu rozprawy doktorskiej, czyli technik biologii molekularnej, począwszy od metod izolacji DNA. Pozyskanie DNA o dobrej jakości dotyczy metod identyfikacji wszystkich mikroorganizmów, nie tylko grzybów, a więc jest kluczowym elementem decydującym o sukcesie. Na stronie 19 autor pisze cyt. „W przeciwieństwie do błon ssaczych, czy ścian komórek bakteryjnych, które są stosunkowo łatwe do dezintegracji z zastosowaniem enzymów litycznych, takich jak proteinaza K i detergentów...” Detergenty nie są enzymami, zaś proteinaza K jest stosowana do trawienia i usuwania zanieczyszczeń białkowych lub inaktywacji nukleaz, natomiast enzymami litycznymi są np. lizozym czy mutanolizyna. Zgadzam się, że grzyby, a szczególnie grzyby pleśniowe, są organizmami, z których trudno jest wyizolować DNA. Proszę o wyjaśnienie, czy metody izolacji DNA różnią się w zależności od tego, czy grzyby pleśniowe są w formie grzybni, zarodników konidialnych, czy askospor.

Kolejny punkt dotyczy omówienia reakcji PCR ze szczegółową charakterystyką polimeraz: najczęściej stosowanych rodzajów tego enzymu i ich właściwości, takich jak specyficzność, termostabilność, wierność i procesywność. Doktorant przedstawił też przebieg

typowej reakcji PCR, z uwzględnieniem parametrów poszczególnych etapów. Nieco dyskusyjne wydaje się w tym miejscu cytowanie własnej pracy magisterskiej. Kolejny rozdział przybliży czytelnikowi technikę real-time PCR. **Rozdział ten jest dobrze napisany, obejmuje wszystkie niezbędne aspekty tej metody.**

Następny rozdział opisuje najnowocześniejszą spośród omówionych, metodę LAMP. Każdy z etapów został dokładnie omówiony i zilustrowany schematami. Uważam jednak, że schematy (rysunek 5 i dalsze) powinny być przygotowane w odpowiednich programach (np. VNTI), co poprawiłoby ich czytelność, ponadto niektóre napisy powinny być w języku polskim – „target”, „DNA Polymerase with strand displacement activity” czy „loop primer”.

Ostatni rozdział dotyczy metod sekwencjonowania DNA. Autor pisze, iż „Dla identyfikacji grzybów markerami takimi są sekwencje genów kodujących: region ITS1 (...) zlokalizowany pomiędzy genami rRNA 18S i 5.8S oraz region D2 dużej podjednostki 28S rRNA”. Proszę o wyjaśnienie, co z identyfikacją grzybów, dla których sekwencje wymienionych genów markerowych są identyczne? Czy znane są inne geny markerowe?

Cel pracy został jasno sformułowany i jest zgodny z tytułem rozprawy. Uważam jednak, że przedstawione cele szczegółowe trafnie powinny być nazwane zakresem pracy.

Podobnie jak w części teoretycznej, w rozdziale opisującym **materiały i metody** widać wyraźną dysproporcję pomiędzy częścią dotyczącą mikroorganizmów, a częścią obejmującą techniki biologii molekularnej. Materiał biologiczny, a szczególnie sposób jego przygotowania do izolacji DNA powinien być dokładniej scharakteryzowany. Zwykle w tego typu opracowaniach podaje się co najmniej nazwę kolekcji i numery pod którymi szczepy zostały zdeponowane, brak takiej informacji dla gatunków *Neosartorya fisheri*, *Byssoscllamys fulva*, *Fusarium culmorum* i *Fusarium graminearum* oraz gatunków wymienionych na stronie 41. Autor podaje dalej, że „DNA izolowano z grzybni szczepów...”. Proszę o podanie szczegółów – na jakiej pożywce hodowano, przez jaki czas i czy była to wyłącznie grzybnia, czy obserwowano również zarodniki konidialne, worki z zarodnikami i askospory.

Mam wątpliwości, co do metody kontaminowania próbek gleby i owoców truskawek przez askospory *T.flavus*. Proszę o wyjaśnienie: czy worki z zarodnikami były dezintegrowane w celu wydobycia askospor, jeśli tak to w jaki sposób i jak kontrolowano przebieg tego procesu. Wskazane byłoby zamieszczenie informacji na temat rodzaju gleby, jej wilgotności, postaci, w jakiej stosowano owoce truskawek, ponieważ te czynniki mają wpływ na homogenność askospor w matrycy naturalnej.

W kolejnych punktach opisane są zastosowane metody izolacji DNA i oceny jakości produktu, a następnie procedury zmierzające do modyfikacji, kolejno: metody PCR, real-time PCR i LAMP. Rozumiem, że bardzo trudno jest oddać w części metodycznej, sekwencyjny charakter pracy, ponieważ wyniki kolejnych badań zmierzających do optymalizacji metod musiały być zawarte już w opisie metodycznym. Jednakże według mojej opinii nie w każdym miejscu zostało jednoznacznie wskazane, jakie elementy były optymalizowane i w jakim zakresie, a w tabelach w części metodycznej są zestawione procedury końcowe, a więc wyniki optymalizacji, a nie jej przebieg.

Opracowując metodę PCR i real-time PCR zaprojektowano startery komplementarne do fragmentu sekwencji genu kodującego czynnik inicjacji replikacji DNA *rifg* w oparciu o 5 sekwencji zdeponowanych w NCBI GenBank. Sekwencje zaprojektowanych starterów oraz ich właściwości, np. temperaturę topnienia T_m przedstawiono już w części metodycznej. Zgodnie z informacją na stronie 44 reakcję PCR optymalizowano w zakresie temperatury oraz czasu hybrydyzacji starterów i czasu etapów wstępnej denaturacji, denaturacji w cyklu i syntezy dsDNA. W tabeli 3 i 4 przedstawione są warunki reakcji PCR i skład mieszaniny będące efektem optymalizacji. Podobnie, w opisie procedur opracowania metody real-time PCR i LAMP zawarte są już wyniki optymalizacji.

Jednym z etapów badań była ocena wpływu betainy na przebieg reakcji amplifikacji w technice PCR. Brak jest jednak zasygnalizowania tego etapu w zakresie pracy.

W pkt. 4.5 optymalizowano stężenie startera, matrycy DNA oraz stężenie składników reakcji i objętość mieszaniny reakcyjnej, czas trwania poszczególnych etapów reakcji, ilość cykli. Podany w metodyce skład i warunki reakcji sekwencjonowania są już wynikiem. Brak jest informacji, jakie sekwencje wykorzystano do zaprojektowania starterów zawartych w tabeli 12. Dobrą praktyką jest zamieszczanie szczegółowych danych na temat sekwencji wykorzystywanych w pracach w formie odrębnego wykazu.

Wyniki badań zostały zaprezentowane w logicznej sekwencji, zgodnie z szczegółowymi celami rozprawy. W pierwszym etapie przedstawiono wyniki doboru metody izolacji DNA, na podstawie oceny uzyskanego preparatu pod względem zanieczyszczenia białkami i peptydami oraz innymi zanieczyszczeniami z wykorzystaniem pomiaru absorbancji. Stwierdzono, iż metoda homogenizacji mechanicznej próbek z sonifikacją, wykorzystująca zestaw EURx Gene MATRIX Plant&Fungi dała najlepsze rezultaty, a szczegółowy protokół izolacji DNA z *Talaromyces flavus* zamieszczono jako odrębny rozdział.

Kolejny etap badań dotyczył wykorzystania metody PCR do detekcji *T.flavus*. Doktorant wykazał, że **technika PCR z zastosowaniem zaprojektowanych starterów jest specyficzna**, gdyż nie obserwował amplikonów w próbkach DNA wyizolowanego z innych gatunków grzybów. Ustalił również, że **próg detekcji tej metody wynosi 5 pg genomowego DNA**.

Następna z modyfikowanych metod – PCR z detekcją w czasie rzeczywistym – okazała się również **specyficzna i pozwoliła na wykrycie już 200 fg genomowego DNA**, a więc była 25-krotnie bardziej czuła niż technika PCR przy zastosowaniu tych samych starterów. Ponadto obecność betainy w mieszaninie reakcyjnej wpłynęła negatywnie na efekt reakcji, spowodowała obniżenie jej czułości. **Jest to bardzo ważne stwierdzenie**. Metoda real-time PCR została również wykorzystana w ocenie zanieczyszczenia gleby i truskawek sztucznie kontaminowanych askosporami *T.flavus*. Pozytywne wyniki obserwowano już dla **640 zarodników w 1g próbki**.

Specyficznością charakteryzowała się kolejna z zaproponowanych metod, tj. technika izotermicznej amplifikacji wykorzystującej zapętlenie LAMP. Była ona również najbardziej czuła, już po 35 minutach obserwowano pozytywny wynik reakcji LAMP dla **stężenia DNA od 10 fg/ μ l do 10 ng/ μ l oraz po 55 minutach dla stężenia 1 fg/ μ l**.

Bardzo ważnym z aplikacyjnego punktu widzenia jest próba detekcji *T.flavus* bez wcześniejszej izolacji DNA za pomocą techniki DirectLAMP. Badania modelowe prowadzone były dla zawiesiny askospor w wodzie i wykazały, iż **po 60 minutach trwania reakcji można wykryć 1 zarodnik w 1 µl mieszaniny reakcyjnej. Należy podkreślić, że metoda ta została po raz pierwszy z powodzeniem zastosowana w celu oznaczenia grzybów termoopornych.** Bardzo przydatna byłaby możliwość zastosowania tej metody do bardziej złożonych matryc, takich jak gleba i owoce. Proszę o informacje, czy takie próby były prowadzone.

Ostatnia część przedstawionych wyników obejmowała identyfikację i analizę filogenetyczną szczepów *Talaromyces flavus*. Wykorzystano w tym celu sekwencje otrzymane zaproponowaną metodą sekwencjonowania. Wykazano wyraźne grupowanie się szczepów *T.flavus* w obrębie rodzaju, co świadczy o specyficzności genu *rIfg*. Czytelność drzewa filogenetycznego poprawiłoby wyraźne oznaczenie badanych szczepów *Talaromyces flavus*.

W rozdziale zatytułowanym **dyskusja** Doktorant porównał uzyskane wyniki z dostępnymi publikacjami naukowymi. Szczególnie istotny jest fragment dotyczący wpływu betainy na przebieg reakcji PCR i qPCR, ponieważ w recenzowanej pracy **wykazano, przeciwnie niż w literaturze, negatywny wpływ tego związku na czułość i wydajność reakcji amplifikacji.** Doktorant przedyskutował przyczyny tego faktu i zaproponował, w jakich przypadkach nie jest wskazane stosowanie betainy.

W dyskusji zamieszczono również fotografie askospor uzyskane za pomocą holotomografu jako ilustrację tezy o przyczynie powodzenia metody DirectLAMP w detekcji askospor grzybów termoopornych. Przedstawiono dwie frakcje o różnym współczynniku załamania światła, a co za tym idzie o różnej gęstości i składzie cytoplazmy. Aspekt ten, choć bardzo ciekawy i wnoszący nowe elementy w poznaniu zjawiska termooporności, moim zdaniem nie jest związany z celem pracy.

Sformułowane **wnioski** znajdują swoje uzasadnienie w wynikach pracy. **Odpowiadają w pełni na postawione cele rozprawy.** Niektóre z nich, w mojej ocenie, są jednak zbyt szczegółowe, np. wniosek nr 2.

Opinia na temat strony redakcyjnej pracy

Z obowiązku Recenzenta muszę zwrócić uwagę na pewne mankamenty, niefortunne sformułowania, czy tzw. literówki, które pojawiły się w tekście, a które nie mają istotnego wpływu na mój pozytywny odbiór pracy.

Poniżej niektóre z nich:

- Rysunek 2 – „*koniddiofor*” zamiast konidiofor
- Rysunek 4 – „*Tzean et al.*” zamiast Tzean i in.
- Str. 28 „*rejonów*” zamiast regionów
- Protokół izolacji DNA (pkt.6) - zapewne chodziło o probówkę przygotowaną w pkt. 1, 2 i 5
- „*elektroferogramy*” zamiast elektroforegramy
- W niektórych miejscach używana jest jednostka mm³, w innych zaś µl
- Str. 46, Tabela 7 - dość niefortunne jest określenie „*etap aktywności enzymatycznej*” – hydroliza deoksyurydyny dU

- Rysunki 10-13 i 14-15 – wskazana ta sama skala osi OY
- Rysunek 18, 19, 27 – brak oznaczenia poszczególnych studzienek na elektroforegramach
- Jest pewna niekonsekwencja w numerowaniu podrozdziałów: 2.2 Metody detekcji; 2.2.1 Izolacja DNA; 2.2.2. PCR, a PCR z detekcją w czasie rzeczywistym jest rozdziałem 2.3. i kolejne 2.4. (LAMP) i 2.5 (sekwencjonowanie DNA)
- W tekście wykorzystywane są skróty, których wykaz zamieszczony na początku rozprawy wydatnie poprawiłby komfort czytania;
- Bibliografia wymaga przeglądu pod względem formatowania – duże/małe litery, nazwy mikroorganizmów kursywą, itp.

Ocena końcowa

Uważam, iż rozprawa doktorska Pana mgr Jacka Panka na temat „Opracowanie metod detekcji grzybów termoopornych z gatunku *Talaromyces flavus* na podstawie technik PCR, real-time PCR oraz LAMP” jest dziełem samodzielnym, o dużej wartości naukowej i aplikacyjnej i stanowi oryginalne rozwiązanie problemów naukowych. Przedstawione uwagi mają charakter polemiczny i nie wpływają na pozytywny odbiór rozprawy doktorskiej.

Pan mgr Jacek Panek wykazał się znajomością swojej tematyki badawczej, umiejętnością interpretacji wyników i formułowania wniosków. Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Wobec powyższego, stwierdzam, iż recenzowana praca spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim wynikające ze stosownych przepisów i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN w Lublinie o dopuszczenie mgr Jacka Panka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

H. Piotrowska