

SYLWIA WDOWIAK-WRÓBEL

UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ W LUBLINIE

**BIORÓŻNORODNOŚĆ, TAKSONOMIA I FILOGENEZA  
MIKROSYMBIONTÓW *ASTRAGALUS CICER* ORAZ  
CHARAKTERYSTYKA ICH WŁAŚCIWOŚCI PROMUJĄCYCH WZROST  
ROŚLIN**

AUTOREFERAT

LUBLIN 2016

**dr Sylwia Wdowiak-Wróbel**  
Zakład Genetyki i Mikrobiologii  
Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej  
ul. Akademicka 19  
20-033 Lublin  
s.wdowiak@poczta.umcs.lublin.pl  
tel. (081) 537-59-82, fax. (081) 537-59-59

## **AUTOREFERAT**

### **1. Imię i nazwisko**

**Sylwia Wdowiak-Wróbel**

### **2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej**

- 1995**            **Tytuł magistra biologii**  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, specjalność: mikrobiologia;  
Tytuł pracy magisterskiej; **Fenotypowa charakterystyka bakterii brodawkowych *Astragalus cicer* (traganek pęcherzykowaty)**  
promotor: Prof. dr hab. Wanda Małek;  
praca magisterska została obroniona 18 lipca 1995 r.
- 2002**            **Stopień doktora nauk biologicznych**  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, dyscyplina: biologia;  
Tytuł rozprawy: **Fenotypowa i genotypowa charakterystyka mikrosymbiontów *Astragalus cicer* [L.] (traganek pęcherzykowaty)**  
promotor: Prof. dr hab. Wanda Małek;  
praca doktorska została obroniona 11 grudnia 2002 r.

### **3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (od 2011 r. przekształcony w Wydział Biologii i Biotechnologii)

<b>01.10.1995 – 31.03.2003</b>	asystent w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej UMCS (obecnie: Zakład Genetyki i Mikrobiologii)
<b>01.04.2003 - 31.03.2015</b>	adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej UMCS (obecnie: Zakład Genetyki i Mikrobiologii)
<b>01.04.2015 – obecnie</b>	asystent w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii UMCS

### **PRZEBIEG PRACY NAUKOWO-BADAWCZEJ**

W 1991 roku podjęłam studia na kierunku biologia, na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie. W 1995 roku uzyskałam tytuł magistra biologii w zakresie mikrobiologii. Pracę magisterską pod tytułem „Fenotypowa charakterystyka bakterii brodawkowych *Astragalus cicer* (traganek pęcherzykowaty)”, wykonałam pod kierunkiem prof. dr hab. Wandy Małek w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej (obecnie Zakład Genetyki i Mikrobiologii). Od 1 października 1995 r. zostałam zatrudniona w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej na stanowisku asystenta. W 2002 r. uzyskałam stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii na podstawie rozprawy doktorskiej „Fenotypowa i genotypowa charakterystyka mikrosymbiontów *Astragalus cicer* [L.] (traganek pęcherzykowaty)” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Wandy Małek. W latach 2003 – 2015 pracowałam na stanowisku adiunkta w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii (ZGiM), a obecnie pracuję na stanowisku asystenta w wyżej wymienionym Zakładzie.

Wiodąca tematyka badawcza ZGiM związana jest z zagadnieniami dotyczącymi bakterii glebowych, tzw. ryzobiów, które wchodzą w układy symbiotyczne z roślinami bobowatymi. Prowadzone badania dotyczą między innymi bioróżnorodności i pokrewieństwa filogenetycznego mikrosymbiontów różnych roślin bobowatych, struktury ich lipopolisacharydu oraz strukturalnej i funkcjonalnej analizy genomów ryzobiów. W Zakładzie prowadzone są również badania dotyczące struktury

lipidów i lipopolisacharydów bakterii reprezentujących rodzaje *Legionella* i *Aeromonas*.

Moje zainteresowania badawcze pokrywają się z główną tematyką ZGiM, a praca doktorska dotyczyła problemów związanych z symbiozą ryzobiów z roślinami bobowatymi.

W swojej rozprawie doktorskiej:

- określiłam właściwości fenotypowe mikrosymbiontów traganka pęcherzykowatego w oparciu o testy fizjologiczne, morfologiczne i biochemiczne;
- z badałam skład kwasów tłuszczowych w komórkach ryzobiów specyficznych dla *A. cicer*;
- ustaliłam relacje filogenetyczne badanych izolatów na podstawie sekwencji zmiennego fragmentu genu 16S rRNA;
- z badałam stopień podobieństwa całkowitego DNA symbiontów *A. cicer* do DNA innych ryzobiów metodą hybrydyzacji Southerna;
- ustaliłam zakres gospodarza roślinnego analizowanych izolatów *A. cicer* oraz strukturę tworzonych przez nie brodawek;
- z badałam morfologię i wielkość genomów bakteriofagów specyficznych dla mikrosymbiontów *A. cicer* oraz ustaliłam ich zakres gospodarza.

Uzyskane wyniki badań zostały opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym z listy JCR (3 publikacje) oraz zaprezentowane na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych (7 komunikatów zjazdowych).

Publikacje:

1. **Wdowiak S.**, Małek W., Grządka M., (2000). Morphology and general characteristics of phages specific for *Astragalus cicer* rhizobia, *Current Microbiology* 40, 110-113.
2. **Wdowiak S.**, Małek W., (2000). Numerical analysis of *Astragalus cicer* microsymbionts, *Current Microbiology* 41, 142-148.
3. **Wdowiak S.**, Małek W., Sajnaga E., Łotocka B., Stępkowski T., Legocki A., (2000). Symbiosis of *Astragalus cicer* with its microsymbionts: partial *nodC* gene sequence, host plant specificity, and root nodule structure, *Antonie van Leeuwenhoek* 78, 63-71.

Komunikaty zjazdowe:

1. **Wdowiak S.**, Małek W., Characteristics of rhizobia isolated from root nodules *Astragalus cicer*, XXIII Polish Society of Microbiologists Conference, Łódź 1996
2. **Wdowiak S.**, Małek W., Phenotypic and genotypic grouping of rhizobia nodulating *Astragalus cicer*, The Third European Nitrogen Fixation Conference, Lunteren, The Netherlands, 1998
3. **Wdowiak S.**, Małek W., Phenotypic and genotypic diversity of rhizobia nodulating *Astragalus cicer*, XIII Polish Genetic Society Conference, Warszawa, 1998
4. **Wdowiak S.**, Małek W., Sajnaga E., Łotocka B., Stępkowski T., Legocki A., The root-nodule symbiosis between *Astragalus cicer* and its microsymbionts, The Fourth European Nitrogen Fixation Conference, Sevilla, Spain, 2000
5. **Wdowiak S.**, Małek W., Grządka M., General characteristics of phages specific for *Astragalus cicer* rhizobia, The Fourth European Nitrogen Fixation Conference, Sevilla, Spain, 2000
6. **Wdowiak S.**, Małek W., Genotypic characteristics of *Astragalus cicer* microsymbionts, XIV Polish Genetic Society Conference, Poznań, 2001
7. **Wdowiak-Wróbel S.**, Małek W., Genomic relationship of *Astragalus cicer* rhizobia with other nodule bacteria, The Fifth European Nitrogen Fixation Conference, Norwich, United Kingdom, 2002

Po uzyskaniu stopnia doktora moje zainteresowania badawcze dotyczyły nadal mikrosymbiontów roślin bobowatych, a przede wszystkim izolatów z brodawek korzeniowych *Astragalus cicer* i *Astragalus glycyphyllos*.

**4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)**

**4a. Tytuł osiągnięcia naukowego:**

**Bioróżnorodność, taksonomia i filogeneza izolatów z brodawek korzeniowych *Astragalus cicer* oraz charakterystyka ich właściwości promujących wzrost roślin**

**4b. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego**

1. **Sylwia Wdowiak-Wróbel**, Wanda Małek\*, (2005). Genomic diversity of *Astragalus cicer* microsymbionts revealed by AFLP fingerprinting, *The Journal of General and Applied Microbiology* 51, 369–378. (IF<sub>2005</sub>-0.909; MNiSW<sub>2005</sub>-10 pkt)
2. **Sylwia Wdowiak-Wróbel**, Wanda Małek\*, (2010). Following phylogenetic tracks of *Astragalus cicer* microsymbionts, *Antonie van Leeuwenhoek* 97, 21–34. doi 10.1007/s10482-009-9384-x. (IF<sub>2010</sub>-1.673; MNiSW<sub>2010</sub>-20 pkt)
3. **Sylwia Wdowiak-Wróbel\***, Agnieszka Leszcz, Wanda Małek, (2013). Salt tolerance in *Astragalus cicer* microsymbionts: the role of glycine betaine in osmoprotection, *Current Microbiology* 66, 428-436. (IF<sub>2013</sub>-1.359; MNiSW<sub>2013</sub>-20 pkt)
4. **Sylwia Wdowiak-Wróbel\***, Wanda Małek, Agnieszka Leszcz, Rafał Typek, Andrzej Lech Dawidowicz, (2016). Effect of osmotic stress on *Astragalus cicer* microsymbiont growth and survival, *European Journal of Soil Biology* 76, 46-52. doi: 10.1016/j.ejsobi.2016.07.005. (IF<sub>2015</sub>-1.951; MNiSW<sub>2015</sub>-30 pkt)
5. **Sylwia Wdowiak-Wróbel\***, Wanda Małek, Marta Palusińska-Szysz, (2016). Low temperature adaptation and the effects of cryoprotectants on mesorhizobia strains, *Journal of Basic Microbiology* 56, 379-391. doi: 10.1002/jobm.201500615. Epub 2016 Feb 16. (IF<sub>2015</sub>-1.823; MNiSW<sub>2015</sub>-20 pkt)
6. **Sylwia Wdowiak-Wróbel\***, Wanda Małek, (2016). Properties of *Astragalus* sp. microsymbionts and their putative role in plant growth promotion, *Archives of Microbiology* 198, 793-801. doi: 10.1007/s00203-016-1243-3. (IF<sub>2015</sub>-1.76; MNiSW<sub>2015</sub>-20 pkt)

**Artykuł przeglądowy:**

7. Wanda Małek\*, **Sylwia Wdowiak-Wróbel**, Małgorzata Targońska, Michał Kalita, Sebastian Gnat, (2012). Osmoadaptacja i systemy transportu potasu w

bakteriach gram-ujemnych, *Postępy Mikrobiologii* 51, 93–98. (IF<sub>2012-0.207</sub>; MNiSW<sub>2012-15 pkt</sub>)

(\* autor korespondencyjny)

Sumaryczny *impact factor* – IF ww. publikacji zgodnie z rokiem opublikowania (dla publikacji z 2016 roku podano IF z 2015): **9,682**

Suma punktów za ww. publikacje zgodnie z wykazem MNiSW (dla publikacji z 2016 roku podano punkty MNiSW z 2015): **135**

#### 4c. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników

##### Wstęp

Azot jest pierwiastkiem biogennym niezbędnym do wzrostu i rozwoju roślin. Powszechnie występująca w przyrodzie forma azotu, N<sub>2</sub>, jest niedostępna dla większości żywych organizmów. Jednym z najważniejszych mechanizmów, podczas którego azot atmosferyczny przekształcany jest w związki przyswajalne przez rośliny jest proces biologicznego wiązania N<sub>2</sub> (Zahran 1999). W procesie tym uczestniczą bakterie, które można podzielić na dwie główne grupy. Pierwszą z nich stanowią mikroorganizmy wolno żyjące, do których możemy zaliczyć między innymi: cyjanobakterie i niektóre gatunki rodzaju *Azotobacter*. Natomiast druga grupa obejmuje mikroorganizmy zdolne do wchodzenia w układy symbiotyczne z roślinami. Należą do nich przedstawiciele rodzaju *Frankia*, będący symbiontami wieloletnich roślin dwuliściennych (np. *Alnus incana*, *Myrica gale*, *Shepherdia canadensis*), czy też ryzobia, wchodzące w symbiozę z roślinami bobowatymi. Do tej pory, spośród opisanych 18 tys. roślin bobowatych, zbadano jedynie około 20% roślin pod kątem ich zdolności do tworzenia układów symbiotycznych z ryzobiami (Zahran 1999; Huguet i in. 2001; Shridhar 2012). Duże zainteresowanie badaczy budzi nie tylko mechanizm tworzenia układów symbiotycznych i wiązania azotu, ale także taksonomia i filogeneza partnerów symbiotycznych oraz możliwość wykorzystania bakterii, jako mikroorganizmów promujących wzrost i rozwój roślin, szczególnie w warunkach stresu.

Początkowa klasyfikacja ryzobiów oparta na zakresie gospodarza roślinnego została z czasem zastąpiona taksonomią wielokierunkową opartą na analizie

numerycznej cech fenotypowych, markerach chemotaksonomicznych oraz technikach biologii molekularnej. W badaniach fenotypowych uwzględnia się cechy morfologiczne, serologiczne i biochemiczne izolatów. W przypadku analizy kwasów nukleinowych bierze się pod uwagę stopień podobieństwa sekwencji genu 16S rRNA oraz stopień podobieństwa DNA:DNA określony metodą hybrydyzacji. Przyjęto, że bakterie wykazujące, co najmniej 70% podobieństwa DNA:DNA i nie mniej niż 97% podobieństwa sekwencji 16S rDNA mogą być zaliczone do tego samego gatunku genomowego. W przypadku stopnia podobieństwa sekwencji genu 16S rRNA wynoszącego 95% i więcej, analizowane szczepy zaliczane są do tego samego rodzaju (Stackebrandt i Goebel 1994). Wykorzystanie w badaniach taksonomicznych technik genomowego odcisku palca, tzw. „fingerprinting”, takich jak, np.: AFLP (polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów restrykcyjnych), czy też rep-PCR (REP, ERIC, BOX) pozwala dodatkowo na ustalenie polimorfizmu genomowego analizowanych szczepów (Rademaker i in. 1998; Menna i in. 2009). W ostatnim czasie analiza sekwencji genu 16S rRNA jest wykorzystywana głównie przy ustalaniu rodzaju badanych izolatów, natomiast do określania pozycji taksonomicznej bakterii na poziomie gatunku, coraz częściej stosuje się wielolokusową analizę sekwencji genów metabolizmu podstawowego, (housekeeping genes; MLSA - Multilocus Sequence Analysis) (Martens i in. 2008; Glaeser i Kämpfer 2015).

Wzrost ilości stosowanych sztucznych nawozów, fitoncydów w rolnictwie, w znacznym stopniu przyczynia się do zanieczyszczenia środowiska naturalnego. Jedną z metod zwalczania zanieczyszczeń środowiska oparta jest na fitoremediacji. Ważną rolę w tym procesie odgrywają bakterie promujące wzrost i rozwój roślin (plant growth promoting bacteria, PGPB), które w znacznym stopniu zwiększają efektywność fitoremediacji. PGPB są reprezentowane przez bakterie wolno żyjące, bakterie endofityczne przykładem, których mogą być mikroorganizmy zdolne do wchodzenia w układy symbiotyczne z roślinami (ryzobia, promieniowiec-*Frankia*) oraz cyjanobakterie. Korzystne działanie tej heterogennej grupy organizmów na rośliny oparte jest na bezpośrednich lub pośrednich oddziaływaniach. Do bezpośrednich mechanizmów zaliczyć możemy: proces biologicznego wiązania azotu, solubilizację fosforanów, produkcję sideroforów, czy też fitohormonów. Mechanizmy pośrednie wiążą się z produkcją antybiotyków, ograniczeniem wpływu zanieczyszczeń na środowisko naturalne (np. poprzez usuwanie jonów metali ciężkich), produkcją cyjanowodoru i enzymów hydrolizujących ścianę komórkową fitopatogenów. PGPB



odgrywają szczególnie ważną rolę w przypadku wystąpienia niekorzystnych warunków środowiskowych, np. suszy, obecności metali ciężkich w glebie, zasolenia, wysokich lub niskich temperatur (Gamalero i Glick 2011; Glick 2012; de Souza i in. 2015). W celu komercyjnego wykorzystania bakterii promujących wzrost roślin, dokonuje się selekcji szczepów najlepiej przystosowanych do specyficznych warunków środowiska.

*Astragalus cicer* (traganek pęcherzykowaty) reprezentuje rodzaj *Astragalus*, obejmujący ponad 3 tys. gatunków roślin występujących w różnych rejonach świata. Traganek pęcherzykowaty jest dziko rosnącą rośliną bobowatą spotykaną w Europie i Azji. Występuje również w Ameryce Północnej (Stany Zjednoczone, Kanada) dokąd został sprowadzony z Europy. Gatunek ten znalazł zastosowanie przy rekultywacji, między innymi terenów po kopalniach odkrywkowych, czy brzegów rzek. Jest on również wykorzystywany w niektórych krajach takich, jak USA, Nowa Zelandia, jako pasza dla zwierząt hodowlanych (Townsend 1993; [https://plants.usda.gov/plantguide/pdf/pg\\_asci4.pdf](https://plants.usda.gov/plantguide/pdf/pg_asci4.pdf)).

W piśmiennictwie naukowym do niedawna brak było doniesień dotyczących układu symbiotycznego ryzobium – *Astragalus cicer*, szczególnie dotyczących pozycji taksonomicznej mikrosymbiontów oraz ich właściwości potencjalnie promujących wzrost i rozwój roślin.

**Podjęte badania miały na celu określenie zróżnicowania genetycznego izolatów z brodawek korzeniowych specyficznych dla traganka pęcherzykowatego oraz określenie ich pozycji taksonomicznej. Wśród tych bakterii zidentyfikowano szczepy wykazujących własności promujące wzrost roślin, tzw. PGPB. Szczepy bakteryjne wykorzystane w badaniach zostały wyizolowane z brodawek korzeniowych *Astragalus cicer* (traganek pęcherzykowaty) pochodzących z różnych rejonów Polski, Kanady i Ukrainy.**

#### **Omówienie osiągniętych wyników:**

1/ Sylwia Wdowiak-Wróbel, Wanda Małek\*, (2005). Genomic diversity of *Astragalus cicer* microsymbionts revealed by AFLP fingerprinting, *The Journal of General and Applied Microbiology*, 51, 369–378.

**(IF<sub>2005</sub>-0.909; MNiSW<sub>2005</sub>-10 pkt)**

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) jest techniką typu LM PCR (ligation mediated PCR), która pozwala na otrzymanie unikalnych dla danego szczepu „odcisków” genomowych. Metoda ta znalazła zastosowanie przy określeniu zróżnicowania genomowego w obrębie gatunku lub między blisko spokrewnionymi gatunkami oraz ustalaniu filogenezy na poziomie populacyjnym (Vos 1995; Terefework i in. 2001).

**Przeprowadzone przeze mnie badania miały na celu określenie stopnia zróżnicowania genomowego mikrosymbiontów traganka pęcherzykowatego oraz ustalenie specyficznych dla danego szczepu wzorów genomowych, umożliwiających szybką identyfikację badanych izolatów.**

Badano 36 szczepów izolowanych z brodawek *A. cicer*, pochodzących z Polski, Ukrainy i Kanady. Do analizy AFLP wybrano rzadko tnący enzym *PstI* oraz 3 selektywne startery: Pst-G, Pst-GC, Pst-A. Analiza porównawcza profili genomowych mikrosymbiontów *A. cicer* oraz szczepów referencyjnych należących do rodzaju *Mesorhizobium* wykazała, że badane izolaty charakteryzują się dużym zróżnicowaniem genomowym i w większości posiadają unikatowy profil genomowy. Nieliczne izolaty z brodawek korzeniowych traganka pęcherzykowatego charakteryzowały się identycznymi wzorami genomowymi. Żaden z przebadanych szczepów nie wykazał profilu genomowego identycznego z profilem szczepu referencyjnego. **Stosując technikę AFLP wykazano, że bakterie specyficzne dla traganka pęcherzykowatego charakteryzują się dużym zróżnicowaniem genomowym, a poziom podobieństwa ich profili genomowych mieści się w zakresie od 9% do 100%. Szczepy różniły się liczbą (od 3 do 9) oraz wielkością (od 180 do 2,265 pz) uzyskanych amplikonów. Na podstawie analizy uzyskanych profili genomowych stwierdzono, że badane izolaty tworzą 3 grupy genomowe. Dwie z nich obejmują szczepy *A. cicer* pochodzące z trzech różnych regionów Polski, natomiast trzecią utworzyły izolaty pochodzące z Ukrainy, Kanady oraz 3 „polskie” szczepy.**

Analiza wykonana przy użyciu AFLP wykazała, że ta metoda może być stosowana do szybkiej identyfikacji bakterii specyficznych dla *A. cicer* i może być użytecznym narzędziem wykorzystywanym w badaniach taksonomicznych ryzobiów.

**2/ Sylwia Wdowiak-Wróbel, Wanda Małek\*, (2010).** Following phylogenetic tracks of *Astragalus cicer* microsymbionts, *Antonie van Leeuwenhoek* 97, 21–34.

**(IF<sub>2010</sub>-1.673; MNiSW<sub>2010</sub>-20 pkt)**

Do chwili obecnej, pod kątem zdolności do wchodzenia w układy symbiotyczne, przebadano niewielką liczbę gatunków roślin reprezentujących rodzaj *Astragalus*. W literaturze naukowej opisano gatunki *Mesorhizobium qingshengii* i *Mesorhizobium huakuii* wyizolowane z *Astragalus sinicus*, gatunek *Mesorhizobium sangaii*, mikrosymbiont *Astragalus luteolus* i *Astragalus ernestii* oraz *Mesorhizobium septentrionale* i *Mesorhizobium temperatum* pochodzące z brodawek korzeniowych *Astragalus adsurgens* (Gao i in. 2004; Zheng i in. 2013; Zhou i in. 2013).

**Podjęte badania miały na celu ustalenie pozycji taksonomicznej oraz określenie historii ewolucyjnej genów rdzeniowych oraz genów symbiotycznych izolatów *A. cicer*, wybranych w oparciu o wcześniejsze analizy fenotypowe i genomowe.**

Badano 3 szczepy pochodzące z Polski, Ukrainy i Kanady. Filogenetyczne pokrewieństwo badanych izolatów określono na podstawie analizy sekwencji genu 16S rRNA i 2 genów metabolizmu podstawowego, *atpD* i *glnII* (kodujących odpowiednio: podjednostkę  $\beta$ -syntazy ATP i syntetazę glutaminy). **Na podstawie analizy porównawczej niemal pełnej sekwencji genu 16S rRNA bakterii specyficznych dla *A. cicer* stwierdzono, że stopień wzajemnego podobieństwa ich sekwencji 16S rDNA wynosił od 98% do 100%. Jednocześnie badane izolaty charakteryzowały się wysokim, wynoszącym 98-100%, stopniem podobieństwa sekwencji 16S rDNA do bakterii rodzaju *Mesorhizobium*.** Na drzewie filogenetycznym utworzonym przy użyciu metody NJ (neighbor-joining) mikrosymbionty *A. cicer* utworzyły wspólne, monofiletyczne grono ze szczepami rodzaju *Mesorhizobium* (przy współczynniku poparcia 100%), co może świadczyć o ich wspólnym pochodzeniu.

**W oparciu o zasadę, że rodzaj tworzą szczepy o 95% i wyższym stopniu podobieństwa sekwencji 16S rDNA bakterie specyficzne dla traganika pęcherzykowatego zostały zaklasyfikowane do rodzaju *Mesorhizobium*.**

Możliwość występowania kilku kopii genu 16S rRNA w genomie bakterii oraz możliwość horyzontalnego transferu tego genu ogranicza jego wykorzystanie w badaniach taksonomicznych. W ostatnim czasie wykazano, że analiza sekwencji kilku

genów metabolizmu podstawowego pozwala na taksonomiczną identyfikację gatunku oraz ustalenie relacji filogenetycznych mikroorganizmów (van Berkum i Terefework 2003; Acinas i in. 2004).

**Wykonana przeze mnie analiza sekwencji genów *atpD* i *glnII* mikrosymbiontów *A. cicer* potwierdziła ich pozycję rodzajową ustaloną w oparciu o gen 16S rRNA.** Stwierdzono, że sekwencje badanych genów *atpD* i *glnII* bakterii specyficznych dla traganka pęcherzykowatego są identyczne w zakresie od 94% do 95% dla *atpD* i od 94% do 96% dla *glnII*. Jednocześnie sekwencje tych genów wykazywały 90-94% identyczność do sekwencji genów *atpD* i *glnII* bakterii rodzaju *Mesorhizobium*. Dodatkowo stwierdzono, że najbliższymi filogenetycznie sąsiadami badanych izolatów są bakterie reprezentujące gatunki: *Mesorhizobium septentrionale* i *Mesorhizobium caraganae*, z którymi mikrosymbionty *A. cicer* tworzyły wspólne grono na drzewach filogenetycznych genów *atpD* i *glnII*. **Uzyskane rezultaty mogą wskazywać na wspólne pochodzenie genów metabolizmu podstawowego ryzobiów specyficznych dla *A. cicer* i bakterii rodzaju *Mesorhizobium*. Jednocześnie wyniki analizy sekwencji genów *atpD* i *glnII* mogą sugerować, że bakterie specyficzne dla *A. cicer* stanowią nowy gatunek w obrębie rodzaju *Mesorhizobium*. Należy podkreślić, że jest to pierwsze doniesienie dotyczące pozycji taksonomicznej mikrosymbiontów traganka pęcherzykowatego.**

Ważną rolę w symbiozie ryzobium-roślina bobowata odgrywają geny *nod* i *nif*. Geny *nod* kodują cząsteczki sygnałne, tzw. czynniki Nod, które warunkują specyficzność gospodarza roślinnego. Ich obecność jest niezbędna w procesie rozpoznania i zakażania odpowiedniej rośliny. Wpływają na aktywację transkrypcji genów dla białek roślinnych – nodulin, skręcanie włóśników korzeniowych, tworzenie nici infekcyjnych, czy też indukcję podziałów komórkowych kory pierwotnej korzenia (Wang i in. 2012; Lira i in. 2015). Geny *nifHDK* kodują nitrogenazę, enzym odpowiadający za wiązanie azotu atmosferycznego N<sub>2</sub>. Drzewa filogenetyczne uzyskane w oparciu o analizę filogenetyczną genów *nod* często nie są zgodne z drzewami utworzonymi na podstawie analizy sekwencji genów 16S rRNA. Wykazano natomiast, że grupowanie gatunków ryzobiów, w oparciu o analizę filogenetyczną genów symbiotycznych, w znacznym stopniu pokrywa się z grupowaniem ich roślinnych gospodarzy na drzewach filogenetycznych utworzonych dla genu *rbcL* (podjednostka rybulozo-1,5-karboksylazy/oksygenazy bifosforanu) lub sekwencji *ITS*, co może wskazywać na koewolucję genów symbiotycznych i genów roślinnych

(Wielbo i Skorupska 2003; Laranjo i in. 2014). Haukka i in. (1998) stwierdzili również, że drzewo filogenetyczne genów *nifH*, podobnie jak w przypadku genów *nod*, najczęściej nie wykazuje korelacji z filogenezą opartą na sekwencji genów 16S rRNA. Wyjaśnieniem tego zjawiska może być horyzontalny transfer genów symbiotycznych, które zlokalizowane są na chromosomalnych wyspach symbiotycznych, np. u *Mesorhizobium loti* lub na plazmidach, np. u bakterii rodzaju *Rhizobium* i *Ensifer* (Laranjo i in. 2014).

**Prowadzone przeze mnie badania miały na celu ustalenie pokrewieństwa mikrosymbiontów *A. cicer* w oparciu o analizę sekwencji genów *nodA*, *nodC* i *nifH*. Za swoje osiągnięcie uważam ustalenie, że wszystkie badane mikrosymbionty traganka pęcherzykowatego wykazywały największe podobieństwo sekwencji analizowanych genów symbiotycznych do odpowiadających im sekwencji genów bakterii należących do rodzaju *Mesorhizobium*. Analiza wykazała że geny symbiotyczne szczepów pochodzących z brodawek *A. cicer* charakteryzowały się największym podobieństwem do odpowiednich genów bakterii wyizolowanych z roślin należących do plemienia *Galegeae*, do którego należy również gospodarz izolatów oraz siostrzanego plemienia *Cicereae*, co może świadczyć o presji gospodarza roślinnego na strukturę tych genów.**

**W przypadku badanych izolatów największe pokrewieństwo genów symbiotycznych, określone w oparciu o analizę sekwencji genów *nod* i *nif*, wykazują szczepy: polski (ACMP18) i ukraiński (CIAM0210), tworzące jedną, wyraźnie odrębną grupę, co wskazuje na wspólne pochodzenie ich genów symbiotycznych. Szczep kanadyjski (USDA3350), w przypadku wszystkich badanych genów symbiotycznych, tworzył odrębną podgrupę w stosunku do pozostałych izolatów z brodawek korzeniowych traganka pęcherzykowatego, razem z bakteriami rodzaju *Mesorhizobium*. Uzyskane rezultaty mogą świadczyć o różnej drodze ewolucyjnej genów symbiotycznych mikrosymbiontów *A. cicer* wynikającej z ich geograficznej separacji i adaptacji do różnych warunków środowiskowych.**

**3/ Wanda Małek\*, Sylwia Wdowiak-Wróbel, Małgorzata Targońska, Michał Kalita, Sebastian Gnat, (2012). Osmoadaptacja i systemy transportu potasu w bakteriach gram-ujemnych, *Postępy Mikrobiologii*, 51, 93–98.**

**(IF<sub>2012-0.207</sub>; MNiSW<sub>2012-15</sub> pkt)**

**4/ Sylwia Wdowiak-Wróbel\***, Agnieszka Leszcz, Wanda Małek, (2013). Salt tolerance in *Astragalus cicer* microsymbionts: the role of glycine betaine in osmoprotection, *Current Microbiology* 66, 428-436.

**(IF<sub>2013</sub>-1.359; MNiSW<sub>2013</sub>-20 pkt)**

Abiotyczne czynniki stresowe, np.: zasolenie, susza, metale ciężkie, czy też ekstremalne temperatury, wpływają negatywnie na rozwój i produktywność roślin. Kluczową rolę w ochronie roślin przed skutkami działania tych czynników odgrywiają PGPB. Ważną sprawą staje się więc selekcja szczepów, które najlepiej potrafią zredukować lub wyeliminować szkodliwy efekt działania czynnika stresowego.

Stres osmotyczny jest jednym z abiotycznych czynników środowiskowych wpływających na wzrost i rozwój roślin, jak również na prawidłowy przebieg procesu symbiozy ryzobium – roślina bobowata. Badania wykazały, że gospodarz roślinny jest bardziej wrażliwy na stres osmotyczny, niż jego ryzobiowy partner. Mikrosymbionty roślin bobowatych wykazują różnice w tolerancji na czynniki stresowe. Niektóre z nich, np. *Ensifer meliloti*, charakteryzują się wysoką tolerancją na stres osmotyczny i są zdolne do wzrostu przy stężeniach od 1.7% do 4% NaCl w podłożu. Bakterie reprezentujące rodzaj *Mesorhizobium* charakteryzują się często większą wrażliwością na stres osmotyczny niż przedstawiciele rodzajów *Ensifer* i *Rhizobium*. Jednak również w obrębie tej grupy można znaleźć gatunki, np. *Mesorhizobium ciceri* i *Mesorhizobium thiogangenicum* wykazujące zdolność wzrostu przy stężeniu NaCl powyżej 1% (Zahran 1999, Laranjo i Oliveira 2011; **publikacja 4**).

Wiele szczepów bakteryjnych ma zdolność adaptacji do warunków stresowych poprzez akumulację kompatybilnych substancji, tj. niskocząsteczkowych związków organicznych, takich jak: aminokwasy i ich pochodne (ektoiny i betainy), cukry, czy też poliiole. Związki te mogą być gromadzone albo na drodze transportu z podłoża do komórki, albo w wyniku syntezy *de novo*. Wykorzystanie wyselekcjonowanych szczepów ryzobiowych opornych na stres osmotyczny może w znacznym stopniu przyczynić się do poprawy wzrostu i rozwoju roślin wrażliwych na zasolenie (Galinski 1995; da Costa i in. 1998; Wood i in. 2001).

**Prowadzone przeze mnie badania miały na celu określenie wpływu stresu osmotycznego na wzrost i przeżywalność mikrosymbiontów *A. cicer*, w obecności i przy braku osmoprotektanta (GB – betainy glicynowej), jak również ustalenie**

**potencjalnych mechanizmów prowadzących do zmniejszenia negatywnych efektów stresu osmotycznego.** W celu określenia tolerancji na stres osmotyczny badane izolaty, tj szczep polski - ACMP18 i kanadyjski - USDA3350 hodowano na podłożu zawierającym od 0.5% do 2% NaCl. **Uzyskane wyniki wskazują, że oba izolaty tolerują do 2% NaCl w podłożu.** Jednocześnie takie stężenie NaCl w podłożu powodowało około czterokrotne wydłużenie czasu generacji u mikrosymbiontów *A. cicer*, w stosunku do kontroli - bez NaCl. **Przeprowadzona analiza wykazała również, osmoprotekcyjny wpływ betainy glicynowej (szczególnie przy wyższych 1.5% i 2% stężeniach NaCl) na przeżywalność bakterii specyficznych dla traganka pęcherzykowatego.** Dodatek 1 mM GB do podłoża powodował skrócenie czasu generacji średnio o około 3 - 4 godz. w przypadku obu szczepów.

W środowisku naturalnym mikroorganizmy często narażone są na stres wywołany między innymi, wahaniami temperatury, pH, obecnością metali ciężkich, czy też zasoleniem. Bakterie wykształciły na drodze ewolucji szereg strategii pozwalających im na przeżycie w niesprzyjających warunkach. Jedną z nich związana jest z przejściem bakterii w stan określany, jako żywe ale niehodowalne (VBNC – viable but not culturable), w którym komórki pozostają żywe, ale nie wykazują wzrostu na podłożach hodowlanych. Zdolność do przejścia w stan VBNC stwierdzono zarówno u bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, np. *Enterococcus* sp., *Escherichia coli*, *Lactobacillus* sp., *Campylobacter* sp. (Li i in. 2014; Ramamurthy i in. 2014).

Zastosowanie mikroskopu konfokalnego w połączeniu z zestawem LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit pozwala na procentową ocenę żywych i martwych komórek. Porównanie wyników uzyskanych przy użyciu mikroskopu z tradycyjnymi metodami posiewu na podłoża bakteryjne umożliwia również ocenę, czy bakterie są żywe, ale niehodowalne.

Obserwacje przy użyciu mikroskopu konfokalnego oraz zestawu barwników SYTO9 i PI wykazały spadek liczby żywych komórek mikrosymbiontów *A. cicer* wraz ze wzrostem stężenia NaCl w podłożu. **Przy 2% stężeniu NaCl przeżywało około 45-50% komórek obu badanych szczepów. Badania potwierdziły również osmoprotekcyjny wpływ betainy glicynowej na przeżywalność izolatów traganka pęcherzykowatego. Dodatek betainy glicynowej do podłoża znacznie zwiększał procent żywych komórek poddanych stresowi osmotycznemu. Osmoprotekcyjny**

wpływ betainy glicynowej był bardziej widoczny przy wyższych stężeniach NaCl. W obecności 1% NaCl przeżywało około 65% komórek, a w obecności 2% NaCl - 60% komórek. Zauważono, że w obecności betainy glicynowej przy danym stężeniu NaCl, liczba żywych komórek obu analizowanych szczepów utrzymywała się na podobnym poziomie. Odnosząc powyższe rezultaty do wyników posiewu na podłoże hodowlane można założyć, że część komórek badanych szczepów mogła przejść w stan, tzw. niehodowalności.

Jeden z mechanizmów umożliwiających utrzymanie turgoru komórki w warunkach szoku osmotycznego opiera się na akumulacji jonów  $K^+$ . W procesie tym uczestniczy szereg systemów transportu, z których do najlepiej poznanych należą transportery: Kdp, Ktr, Kup i Trk. Badania wykazały, że u większości mikroorganizmów, akumulacja jonów potasu po wystąpieniu szoku osmotycznego jest stanem przejściowym, a dalsze funkcje ochronne, przy przedłużającym się stresie, przejmują związki kompatybilne, chroniące komórkę przed skutkami stresu (**publikacja 3**). Jednym z takich związków jest betaina glicynowa (GB), której syntezę w warunkach stresu wykazano u wielu mikroorganizmów oraz roślin. Betaina glicynowa może być również transportowana do komórki ze środowiska zewnętrznego (**publikacja 3**). Jednym z systemów zaangażowanych w transport tego związku jest system ProU, wykryty u *Escherichia coli* i *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium. Tworzą go 3 geny: *proV*, *proW* i *proX* zorganizowane w operon *proU* (Haardt i Bremer 1996; Csonka i Epstein 1996). Do chwili obecnej w literaturze naukowej nie ma doniesień na temat występowania takich systemów u bakterii rodzaju *Mesorhizobium*, który reprezentują mikrosymbionty *A. cicer*.

**W oparciu o sekwencje nukleotydowe genów *proV*, *proW* i *proX*, dostępne w bazie danych GenBank, zaprojektowano zdegenerowane startery komplementarne do konserwatywnych regionów tych genów. Otrzymane startery posłużyły do amplifikacji genów *proV*, *proW* i *proX*, a uzyskane w ten sposób sekwencje nukleotydowe zostały porównane z sekwencjami dostępnymi w bazie danych GenBank. Analiza porównawcza uzyskanych sekwencji genów wykazała, że w genomach mikrosymbiontów *A. cicer* występują sekwencje homologiczne do sekwencji genów *proV*, *proW* i *proX* tworzących operon *proU* u *E. coli* i operon podobny do *proU* u *E. meliloti*.**

Dane literaturowe wskazują, że w przypadku niektórych mikroorganizmów betaina glicynowa, może pełnić rolę osmoprotektanta i/lub stanowić źródło węgla i



azotu dla tych organizmów. **Wykazano, że bakterie specyficzne dla *A. cicer* są zdolne do wykorzystywania betainy glicynowej zarówno, jako źródło węgla, jak i azotu. Jednocześnie stwierdzono, że wyższe stężenia NaCl w podłożu hamowały wykorzystywanie GB, jako źródła C i N przez mikrosymbionty traganka pęcherzykowatego.**

**5/ Sylwia Wdowiak-Wróbel\***, Wanda Małek, Agnieszka Leszcz, Rafał Typek, Andrzej Lech Dawidowicz, (2016). Effect of osmotic stress on *Astragalus cicer* microsymbiont growth and survival, *European Journal of Soil Biology*, 76, 46-52.

**(IF<sub>2015</sub>-1.951; MNiSW<sub>2015</sub>-30 pkt)**

**Analiza dotycząca wpływu czynników stresowych, tj. sacharozy, glikolu polietylenowego i KCl na wzrost i przeżywalność mikrosymbiontów *A. cicer* wykazała, że ze wzrostem stężenia tych czynników w podłożu wydłużał się czas generacji badanych szczepów. Stwierdzono także, że szczepy ACMP18 i USDA3350 zdolne były do wzrostu przy wszystkich badanych stężeniach KCl, natomiast wysokie stężenia sacharozy (30%) i PEG (24%, 30%) hamowały wzrost tych bakterii. Przeprowadzone badania wykazały, że betaina glicynowa wykazuje osmoprotekcyjne działanie na ryzobia specyficzne dla *A. cicer*, częściowo niwelując negatywne skutki wywołane stresem.**

Zdolność do tworzenia biofilmu umożliwia bakteriom glebowym kolonizację środowiska oraz przeżycie w warunkach stresowych (np. wysuszenie, zasolenie, ekstremalne pH i temperatura). W przypadku ryzobiów biofilm odgrywa również ważną rolę w rozwoju symbiozy z gospodarzem roślinnym (Rinaudi i Giordano 2010).

Prowadzone badania miały na celu określenie wpływu czynników stresowych (sacharozy, glikolu polietylenowego i KCl) na tworzenie biofilmów przez szczepy ACMP18 i USDA3350. **Wykazano, że szczep USDA3350 charakteryzuje się większą efektywnością tworzenia biofilmów, niż ACMP18.** Największą efektywność tworzenia biofilmów przez mikrosymbionty z traganka pęcherzykowatego stwierdzono w obecności 0.5% KCl i 5% sacharozy, natomiast wyższe stężenia tych czynników stresowych wpływało hamująco na jego rozwój. Glikol polietylenowy działał hamująco na efektywność tworzenia biofilmów przez badane bakterie. Zaobserwowano jedynie niewielki przyrost biofilmu w obecności 9% PEG w podłożu hodowlanym.

Stres osmotyczny u bakterii może przyczyniać się do wzrostu stężenia aminokwasów, takich jak: glutamina, prolina, alanina i glicyna. Badania dotyczące mechanizmów adaptacyjnych w odpowiedzi na czynniki stresowe wykazały, że u wielu mikroorganizmów obecność betainy glicynowej zmniejsza stężenie aminokwasów produkowanych w warunkach stresu (Csonka 1989; Glaasker i in. 1996; Poolman i Glaasker 1998; Zahran 1999).

**Zastosowanie metody HPLC pozwoliło na określenie zmian w puli aminokwasów w komórkach mikrosymbiontów *A. cicer*, pod wpływem różnych stężeń czynników stresowych, tj.: sacharozy, KCl i glikolu polietylenowego (PEG), w obecności i przy braku osmoprotektanta – betainy glicynowej. Uzyskane rezultaty wykazały, że stres wywołany obecnością sacharozy i PEG powodował zwiększenie ilości glutaminy, alaniny i glicyny w puli aminokwasowej komórek, natomiast w obecności KCl zaobserwowano wzrost glutaminy i alaniny. Stwierdzono, że betaina glicynowa wykazywała właściwości osmoprotekcyjne w stosunku do badanych bakterii narażonych na działanie czynników stresowych. Analiza HPLC wykazała, że obecność betainy glicynowej w podłożu powodowała zmniejszenie stężenia glutaminy, alaniny i glicyny w komórkach bakteryjnych w stosunku do komórek hodowanych na podłożu bez osmoprotektanta.**

**6/ Sylwia Wdowiak-Wróbel\***, Wanda Małek, Marta Palusińska-Szys, (2016). Low temperature adaptation and the effects of cryoprotectants on mesorhizobia strains, *Journal of Basic Microbiology* 56, 379-391.

**(IF<sub>2015</sub>-1.823; MNiSW<sub>2015</sub>-20 pkt)**

Niska temperatura jest jednym z czynników stresowych, wpływających na efektywność tworzenia układów symbiotycznych ryzobium – roślina bobowata oraz przeżywalność partnerów symbiozy. Gwałtowny spadek temperatury przyczynia się do szeregu zmian w bakteriach, które dotyczą między innymi zmniejszenia płynności błon i stabilności drugorzędowych struktur DNA i RNA oraz zmniejszenia wydajności procesów transkrypcji, translacji i replikacji DNA (Barria i in. 2013).

**Przeprowadzone badania miały na celu określenie zakresu tolerancji na niskie temperatury (5°C, 10°C i 15°C) dwóch izolatów specyficznych dla *A. cicer* oraz szczepu referencyjnego *Mesorhizobium temperatum* LMG23931. Badania wykazały, że zarówno izolaty z *A. cicer*, jak i szczep *M. temperatum* LMG23931 są**

**zdolne do wzrostu we wszystkich badanych temperaturach.** Należy jednak zauważyć, że w temperaturze 5°C mikrosymbionty traganka pęcherzykowego charakteryzowały się najdłuższym czasem generacji, który był ponad 5 razy dłuższy od czasu generacji określonego w warunkach optymalnych, tj. w 28°C. **Mikroorganizmy, których optimum temperatury wzrostu mieści się w zakresie 20-30°C, a jednocześnie wykazują one zdolność wzrostu w temperaturze 5°C lub niższej zaliczane są do psychrotrofów. Zgodnie z tą definicją, stwierdziliśmy, że badane szczepy specyficzne dla traganka pęcherzykowego reprezentują tę grupę bakterii.**

Bakterie wytworzyły szereg mechanizmów adaptacyjnych pozwalających im na przeżycie w warunkach stresu wywołanego niską temperaturą. Jeden z nich związany jest ze zmianami płynności i przepuszczalności błony cytoplazmatycznej na skutek ilościowej i jakościowej zmiany składu kwasów tłuszczowych. Wykazano, że niska temperatura powoduje u bakterii wzrost ilości nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz kwasów tłuszczowych o krótszych łańcuchach. Dodatkowo zaobserwowano zwiększenie ilości kwasów tłuszczowych o izomerii *anteiso* w stosunku do kwasów o izomerii *iso* (D'Amico i in. 2006).

Zastosowanie chromatografii gazowej ze spektrometrią masową (GC/MS) pozwoliło na określenie zmian profilu kwasów tłuszczowych u bakterii poddanych stresowi związanemu z niskimi temperaturami. Analiza składu kwasów tłuszczowych (FA) uzyskanych w formie estrów metylowych po saponifikacji, ekstrakcji i metanolizie całych komórek trzech szczepów (ACMP18, USDA3350 i *M. temperatum* LMG23931) hodowanych w różnych temperaturach (5°C, 10°C, 15°C oraz 28°C) wykazała obecność kwasów o długości łańcucha od 14 do 19 atomów węgla w cząsteczce. **W temperaturze 28°C (kontrola) stwierdzono wysoką zawartość kwasu 11, 12-metylenooktadekanowego (19:0 cyc) posiadającego strukturę pierścienia cyklopropanowego. Dodatkowo kwasy tłuszczowe analizowanych szczepów, reprezentowane były przez kwas: *cis*-wakcenowy (18:1 $\omega$ <sup>11</sup>) i palmitynowy (16:0). Wyniki badań wskazują, że stres wywołany niską temperaturą powodował włączenie mechanizmów adaptacji i przesunięcia puli kwasów tłuszczowych w kierunku kwasów nienasyconych. Bakterie hodowane w temperaturze 5°C, 10°C i 15°C charakteryzowały się wysoką zawartością *cis*-wakcenowego (18:1 $\omega$ <sup>11</sup>) kwasu tłuszczowego.**

Rośliny i mikroorganizmy w strefie umiarkowanej są często narażone na duże, sezonowe, wahania temperatur. Zmiany temperatury mogą przyczyniać do zmian w populacji mikroorganizmów, wpływać na tworzenie symbiozy ryzobia-rośliny bobowate, czy też produktywność roślin. Dodatkowo, w przypadku szczepów PGPB wykorzystywanych, jako inokulanty roślin, ważny problem stanowią warunki ich przechowywania.

**Prowadzone badania miały na celu ustalenie stopnia przeżywalności bakterii w warunkach zamrożenia.** Szczepy ACMP18, USDA3350 i *M. temperatum* LMG23931 przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  i  $-70^{\circ}\text{C}$ , bez i w obecności różnych krioprotektantów (betaina glicynowa, trehaloza, glicerol i sacharoza/pepton) przez okres 24 miesięcy. **Wykazano, że spośród czterech badanych protektantów, najlepszy krioprotekcyjny wpływ na przeżywalność bakterii wykazał: glicerol i sacharoza/pepton.** Stwierdzono również, że badane bakterie, w obecności tych protektantów, tj. glicerolu lub sacharozy/peptonu, charakteryzowały się lepszą przeżywalnością w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$ , niż  $-20^{\circ}\text{C}$ . Uzyskane wyniki zostały potwierdzone przy użyciu mikroskopii konfokalnej i zestawu LIVE/DEAD BacLight.

Jedną z strategii, umożliwiającą mikroorganizmom przeżycie w niskich temperaturach, związana jest z syntezą białek uczestniczących w odpowiedzi na stres wywołany zimnem, tzw. białek CS (cold shock). Wśród tych białek wyróżnić można między innymi białka szoku zimnego, Csp (cold shock proteins) oraz białka Cip (cold induced proteins). Do chwili obecnej opisano szereg białek rodziny Csp, które działają jak chaperony stabilizując strukturę drugorzędową i przywracając funkcjonalność RNA. Wykryte w *Escherichia coli* białko CspA działa również jako anty-terminator transkrypcji. Obecność białek homologicznych do białka CspA stwierdzono także u innych Gram-dodatnich i Gram-ujemnych bakterii np. *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, czy też *Ensifer meliloti* (Phadtare 2004; Barria i in. 2013).

W oparciu o sekwencje genów *cspA* dostępne w bazie danych GenBank zaprojektowane zostały zdegenerowane startery komplementarne do konserwatywnych sekwencji tych genów. **Analiza PCR z wykorzystaniem tych starterów pozwoliła zidentyfikować w genomach badanych szczepów ACMP18, USDA3350 i *M. temperatum* LMG23931, sekwencje homologiczne do sekwencji genu *cspA* występującego u innych bakterii. Mikrosymbiony *A. cicer* wykazywały największe podobieństwo sekwencji nukleotydowych genu *cspA* w stosunku do siebie (94%), natomiast stopień podobieństwa sekwencji tego genu do sekwencji**

**przedstawicielei rodzaju *Mesorhizobium* mieścił się w zakresie od 83% do 87%.** Filogenetyczna analiza sekwencji genu *cspA*, przy użyciu metody „neighbor-joining” wykazała, że badane szczepy utworzyły wspólne monofiletyczne grono z bakteriami rodzaju *Mesorhizobium* przy współczynniku poparcia wynoszącym 100%. Pozostałe grupy bakterii brodawkowych na filogramie obejmowały przedstawicielei rodzajów: *Rhizobium*, *Ensifer*, *Bradyrhizobium* i *Azorhizobium* (podobieństwo sekwencji genu *cspA* szczepu ACMP18, USDA3350 i referencyjnych ryzobiów wyniosło odpowiednio: 68-73%, 67-71%, 66-70% i 63-67%).

**Hybrydyzacja metodą Southerna, genomowego DNA badanych szczepów, do sondy genu *cspA* *Mesorhizobium* sp. USDA3350, potwierdziła obecność genu *cspA* w ich genomach.** Zastosowanie tej metody pozwoliło również na ustalenie liczby kopii genu *csp* w genomach szczepów ACMP18, USDA3350 i *M. temperatum* LMG23931. **U *Mesorhizobium* sp. ACMP18 i *M. temperatum* LMG23931 stwierdzono obecność 2 kopii genów, natomiast w szczepie *Mesorhizobium* sp. USDA3350 wykryto 3 kopie.**

Zastosowanie techniki RT-PCR umożliwiło określenie ekspresji genu *cspA* w warunkach kontrolnych 28°C i stresowych wywołanych działaniem niskich temperatur (5°C, 10°C i 15°C). **Spadek temperatury (z 28°C do 15°C, 10°C i 5°C) powodował u badanych szczepów indukcję ekspresji genu *cspA*, co może wskazywać na rolę produktu tego genu w procesach adaptacji do warunków stresowych wywołanych zimą.**

**7/ Sylwia Wdowiak-Wróbel, Wanda Małek, (2016).** Properties of *Astragalus* sp. microsymbionts and their putative role in plant growth promotion, *Archives of Microbiology* 198, 793-801. doi: 10.1007/s00203-016-1243-3

**(IF<sub>2015</sub>-1.76; MNiSW<sub>2015</sub>-20 pkt)**

Współczesne rolnictwo w dużej mierze oparte jest na stosowaniu nawozów sztucznych, fungicydów, herbicydów oraz środków owadobójczych. Związki te w dużych ilościach przyczyniają się do wzrostu zanieczyszczeń i degradacji środowiska naturalnego. Jedną ze strategii pozwalających na zmniejszenie zużycia sztucznych nawozów jest możliwość wykorzystania bakterii reprezentujących PGPB w rolnictwie.

PGPB wytworzyły szereg mechanizmów promujących wzrost i indukujących odporność systemiczną roślin na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe. Do

ważnych cech charakteryzujących tę grupę bakterii zaliczamy między innymi: zdolność biologicznego wiązania azotu, solubilizację fosforanów, aktywność deaminazy ACC, produkcję fitohormonów i sideroforów (Glick 2014; de Souza i in. 2015).

Rośliny pobierają fosfor w postaci jonów kwasu fosforowego (V), jednak większość fosforu w glebie występuje w formie niedostępnej dla roślin. Niska dostępność tego pierwiastka jest często czynnikiem ograniczającym ich rozwój. Ważną rolę w zwiększeniu dostępności fosforu odgrywają bakterie zdolne do solubilizacji nieorganicznych i organicznych form fosforu (Sharma i in. 2013; Ahemad i Kibret 2014).

Prowadzone badania miały na celu wyselekcjonowanie szczepów mających najlepsze właściwości promujące wzrost i rozwój roślin. Badano 8 szczepów, 4 z nich reprezentowały mikrosymbionty *A. cicer*, a kolejne 4 to symbionty *Astragalus glycyphyllos*. **Uzyskane wyniki wykazały, że wszystkie badane mikrosymbionty *Astragalus* sp. wykazują zdolność do solubilizacji fosforanów, przy czym największą aktywnością charakteryzowały się szczepy ACMP18 i USDA3350 używane we wcześniejszych analizach.** Ich wykorzystanie może w znacznym stopniu przyczynić się do zwiększenia dostępności fosforu dla roślin.

Rozwój przemysłu w znacznym stopniu przyczynia się do zanieczyszczenia środowiska toksycznymi metalami ciężkimi. Ich obecność w glebie ma wpływ na przeżywalność mikroorganizmów, roślin i efektywność tworzonych układów symbiotycznych ryzobia-rośliny bobowate. Niektóre z bakterii wykazują zdolność bioremediacji metali ciężkich na drodze: adsorpcji i akumulacji, produkcji enzymów lub bioaktywnych metabolitów, które zmniejszają toksyczność tych metali, czy też utleniania metali ciężkich (Ahmad i in. 2012; Ahemad i Kibret 2014). Zastosowanie, w postaci biopreparatów, PGPB zdolnych do bioremediacji metali ciężkich może w znacznym stopniu wpłynąć na poprawę wzrostu i rozwoju roślin na glebach zanieczyszczonych tymi metalami (Pajuelo i in. 2008).

**Celem prowadzonych badań było określenie zakresu tolerancji bakterii specyficznych dla *A. cicer* i *A. glycyphyllos* na toksyczne działanie metali ciężkich (Zn, Pb i Cd).** Wyniki badań wskazują, że wszystkie mikrosymbionty *Astragalus* sp. charakteryzowały się niską tolerancją na kadm. Jedynie dwa szczepy, AG1 i AG27 izolaty z brodawek korzeniowych *A. glycyphyllos* wykazały słaby wzrost przy stężeniu

100 µg/ml kadmu. **Większość spośród 8 przebadanych szczepów tragankowych była zdolna do wzrostu przy 750 µg/ml stężeniu cynku i ołowiu w podłożu.**

Produkcja fitohormonów przez PGPB w znacznym stopniu przyczynia się do poprawy wzrostu i rozwoju roślin. Niektóre bakterie zdolne są do syntezy auksyn, cytokinin i/lub giberelin. Jednym z najczęściej badanych fitohormonów jest przedstawiciel auksyn, kwas indolilo-3-octowy (IAA). Wpływa on na szereg procesów u roślin, takich jak: podziały komórek, ich wydłużanie i różnicowanie, kiełkowanie nasion, tworzenie barwników, wzrost ilości ksylemu, rozwój korzenia, czy też oporność na warunki stresowe. Dodatkowo wzrost poziomu auksyn produkowanych przez ryzobia może wpływać na tworzenie brodawek (ich obecność jest ważna w rozwoju primodium brodawki) (Glick 2012). Stwierdzono również, że IAA produkowane przez bakterie i rośliny może indukować produkcję roślinnej syntazy ACC, odpowiadającej za syntezę kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (ACC), prekursora etylenu. Wpływ na zwiększoną produkcję ACC mają również czynniki stresowe, takie jak: niska temperatura, metale ciężkie, susza, czy infekcje patogenami. Enzym deaminaza ACC, produkowany przez niektóre PGPB, przekształca ACC w  $\alpha$ -ketomaślan i amoniak, chroniąc rośliny przed wysokim stężeniem etylenu. Dodatkowo powstający w trakcie hydrolizy ACC amoniak staje się źródłem azotu dla mikroorganizmów (Glick 2014).

**Badania dotyczące produkcji kwasu inolilo-3-octowego wykazały, że większość z badanych mikrosymbiontów *A. cicer* i *A. glycyphyllos* wykazywała zdolność do jego syntezy.**

Analiza sekwencji nukleotydowych genów *acdS* dostępnych w bazie danych GenBank umożliwiła zaprojektowanie zdegenerowanych starterów komplementarnych do konserwatywnych regionów tego genu. **W oparciu o analizę uzyskanych sekwencji nukleotydowych stwierdzono, że w genomach mikrosymbiontów *Astragalus cicer* i *Astragalus glycyphyllos* występują geny homologiczne do genu *acdS*. Sekwencje genu *acdS* badanych szczepów charakteryzowały się najwyższym stopniem podobieństwa (86-94%) do sekwencji tego genu bakterii rodzaju *Mesorhizobium*. Na filogramie utworzonym w oparciu o sekwencje genu *acdS* badane izolaty utworzyły monofiletyczną grupę z bakteriami rodzaju *Mesorhizobium*. Filogenetyczna analiza genu *acdS* wykazała, że mikrosymbionty *A. glycyphyllos* charakteryzują się największym stopniem podobieństwa sekwencji do sekwencji tego genu *M. ciceri* i *M. mediterraneum*. Izolaty z *A. cicer* utworzyły dwie**

podgrupy w obrębie grupy obejmującej bakterie rodzaju *Mesorhizobium*. Jedną z nich obejmowała szczepy AW1/3, ACMP18, CIAM0210 i *M. loti*. Drugą utworzył szczep USDA3350 z przedstawicielami gatunków *M. chacoense*, *M. albiziae* i *M. tianshanense*.

**Hybrydyzacja metodą Southern wykazała obecność jednej kopii genu *acdS* w genomach bakterii specyficznych dla *A. cicer* i *A. glycyphyllos*.**

Podobnie, jak opisano dla innych bakterii rodzaju *Mesorhizobium*, izolaty z brodawek korzeniowych *A. cicer* i *A. glycyphyllos*, nie wykazały aktywności deaminazy ACC w warunkach saprofitycznych.

**Za główne osiągnięcia przeprowadzonych badań uważam:**

- ustalenie pozycji rodzajowej mikrosymbiontów *A. cicer*, wskazujące jednocześnie, na możliwość wyodrębnienia nowego gatunku w obrębie rodzaju *Mesorhizobium*;
- wykazanie dużego zróżnicowania genomowego badanych izolatów *A. cicer*,
- ustalenie poziomu tolerancji badanych mikrosymbiontów na warunki stresowe wywołane zasoleniem, niską temperaturą i metalami ciężkimi;
- wykazanie osmoprotekcyjnych właściwości betainy glicynowej w warunkach stresu osmotycznego mikrosymbiontów *A. cicer*;
- identyfikacja genu *csp*, którego produkt uczestniczy w procesach adaptacyjnych na stres wywołany niską temperaturą,
- identyfikacja genów *acdS* w genomach symbiontów *Astragalus cicer* i *Astragalus glycyphyllos* oraz genów *proVWX* w genomach symbiontów *Astragalus cicer*. Produkty tych genów uczestniczą w odpowiedzi bakterii na warunki stresowe.

**Literatura**

**Acinas S.G., Marcelino L.A., Klepac-Ceraj V., Polz M.F.** 2004. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. J. Bacteriol. 186, 2629–2635.

**Ahmad E., Zaidi A., Khan M.S., Oves M.** 2012. Heavy metal toxicity to symbiotic nitrogen-fixing microorganism and host legumes. In: Toxicity of Heavy Metals to Legumes and Bioremediation (eds.: Zaidi A. et al.), Springer-Verlag/Wien. doi: 10.1007/978-3-7091-0730-0\_2.

**Ahemad M., Kibret M.** 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. J. King Saud University – Science 26, 1–20.

**Barria C., Malecki M., Arraiano C.M.** 2013. Bacterial adaptation to cold. Microbiol. 159, 2437-2443.

**Csonka L.N.** 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. Microbiol. Rev. 53, 121-147.



- Csonka L.N., Epstein W.** 1996. Osmoregulation. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. (eds. Neidhardt, F.C. et al.). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 1210 – 1223.
- D'Amico S., Collins T., Marx J.C., Feller G., Gerday C.** 2006. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Rep.* 7, 385–389.
- da Costa M.S., Santos H., Galinski E.A.** 1998. An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 61, 117-53.
- de Souza R., Ambrosini A., Passaglia L.M.P.** 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Gen. Mol. Biol.* 38, 401-419.
- Galinski E.A.** 1995. Osmoadaptation in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 37, 272-328.
- Gamalero E., Glick B.R.** 2011. Mechanisms used by plant growth-promoting bacteria. In *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management* Editors: Dinesh K. Maheshwari. Springer Berlin Heidelberg 17-46.
- Gao J.L., Turner S.L., Kan F.L., Wang E.T., Tan Z.Y., Qiu Y.H., Gu J., Terefework Z., Young J.P.W., Lindström K., Chen W.X.** 2004. *Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum* sp. nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 2003-2012.
- Glaasker E., Konings W.N., Poolman B.** 1996. Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 178, 575-582.
- Glaeser S.P., Kämpfer P.** 2015. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Syst. Appl. Microbiol.* 38, 237-245.
- Glick B.R.** 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*. <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>
- Glick B.R.** 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* 169, 30-39.
- Haardt M., Bremer E.** 1996. Use of *phoA* and *lacZ* fusions to study the membrane topology of ProW, a component of the osmoregulated ProU transport system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178, 5370-81.
- Haukka K., Lindström K., Young J.P.W.** 1998. Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 419-426.
- Huguet, V., McCray Batzli J., Zimpfer J.F., Normand P., Dawson J.O., Fernandez M. P.** 2001. Diversity and specificity of *Frankia* strains in nodules of sympatric *Myrica gale*, *Alnus incana*, and *Shepherdia canadensis* determined by *rrs* gene polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2116-2122.
- Laranjo M., Oliveira S.** 2011. Tolerance of *Mesorhizobium* type strains to different environmental stresses. *Ant. van Leeuwen.* 99, 651-662.
- Laranjo M., Alexandre A., Oliveira S.** 2014. Legume growth-promoting rhizobia: an overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiol. Res.* 169, 2-17.
- Li L., Mendis N., Trigui H., Oliver J.D., Faucher S.P.** 2014. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 5, 258. doi: 10.3389/fmicb.2014.00258

- Lira M.A.Jr., Nascimento L.R.S., Fracetto G.G.M.** 2015. Legume-rhizobia signal exchange: promiscuity and environmental effects. *Front. Microbiol.* 6, 945. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00945>.
- Martens M., Dawyndt P., Coopman R., Gillis M., De Vos P., Willems A.** 2008. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 200-214.
- Menna P., Pereira A.A., Bangel E.V., Hungria M.** 2009. rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. *Symbiosis* (2009) 48, 120-130.
- Pajuelo E., Dary M., Palomares A., Rodriguez-Llorente I., Carrasco J., Chamber M.** 2008. Biorhizoremediation of heavy metals toxicity using rhizobium-legume symbioses. *Biological Nitrogen Fixation: Towards Poverty Alleviation through Sustainable Agriculture*, Springer Netherlands 42, 101–104.
- Phadtare S.** 2004. Recent developments in bacterial cold-shock response. *Curr. Issues Mol. Biol.* 6, 125-136.
- Poolman B., Glaasker E.** 1998. Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol.* 29, 397-407.
- Rademaker J.L. W., Louws F.J., de Bruijn F.J.** 1998. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In *Molecular Microbial Ecology Manual*, (Edited by A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas & F. J. de Bruijn. Dordrecht: Kluwer), supplement 3, chapter 3.4.3, 1-26.
- Ramamurthy T., Ghosh A., Pazhani G.P., Shinoda S.** 2014. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. *Front. Public Health* 2, 103. doi: 10.3389/fpubh.2014.00103
- Rinaudi L.V., Giordano W.** 2010. An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett.* 304, 1–11.
- Sharma S.B., Sayyed R.Z., Trivedi M.H., Gobi T.A.** 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils *Springerplus*. 2: 587. doi: 10.1186/2193-1801-2-587.
- Shridhar B.S.** 2012. Review: Nitrogen Fixing Microorganisms. *Int. J. Microbiol. Res.* 3, 46-52.
- Stackebrandt E., Goebel B.M.** 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 846–849.
- Terefework Z., Kaijalainen S., Lindström K.** 2001. AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolated from *Galega orientalis* and *Galega officinalis*. *J. Biotech.* 91, 169-180.
- Townsend C.E.** 1993. Breeding, physiology, culture, and utilization of cicer milkvetch (*Astragalus cicer* L.). *Adv. Agron.*, 49, 253 – 308.
- van Berkum P., Terefework Z., Paulin L., Suomalainen S., Lindström K., Eardly B.D.** 2003. Discordant phylogenies within the *rrn* loci of rhizobia. *J. Bacteriol.* 185, 2988–2998.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M.** 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23, 4407-4414.
- Wang D., Yang S., Tang F., Zhu H.** 2012. Symbiosis specificity in the legume – rhizobial mutualism. *Cell. Microbiol.* 14, 334–342.

**Wielbo J., Skorupska A.** 2003. Ewolucja układu symbiotycznego rhizobium – rośliny motylkowate. *Post. Mikrobiol.* 42, 263-283.

**Wood J.M., Bremer E., Csonka L.N., Kraemer R., Poolman B., van der Heide T., Smith L.T.** 2001. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* 130, 437–460.

**Zahran H.H.** 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 968-989.

**Zheng W.T., Jr L.Y., Wang R., Sui X.H., Zhang X.X., Zhang J.J., Wang E.T., Chen W.X.** 2013. *Mesorhizobium qingshengii* sp. nov., isolated from effective nodules of *Astragalus sinicus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 2002-2007.

**Zhou S., Li Q., Jiang H., Lindström K., Zhang X.** 2013. *Mesorhizobium sangaii* sp. nov., isolated from the root nodules of *Astragalus luteolus* and *Astragalus ernestii*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 2794-2799.

## 5. Inne osiągnięcia naukowo-badawcze

Omówienie innych prac naukowo-badawczych niewliczanych do osiągnięcia naukowego stanowiącego monotematyczny cykl publikacji.

### 5.1. Publikacje

#### Prace doświadczalne

**P1.** Małek W., Sajnaga E., **Wdowiak-Wróbel S.**, Studzińska B., Słomka M., Agnieszka Tatar, Nosalewicz I., Gawron A., **2005.** Characterization of phages virulent for *Sarothamnus scoparius* bradyrhizobia, *Current Microbiology* 51, 244-249. **(IF–1.21; MNiSW-10 pkt)**

Badano 4 bakteriofagi ( $\phi$ D1,  $\phi$ T1,  $\phi$ CYT21 i  $\phi$ OS6) wyizolowane z ryzosfery rośliny bobowatej *Sarothamnus scoparius* (żarnowiec miotlasty). Na podstawie analizy zakresu gospodarza, bakteriofagi podzielono na dwie grupy. Pierwsza obejmuje fagi  $\phi$ CYT21 i  $\phi$ OS6, zdolne do lizy 9 spośród 30 przebadanych mikrosymbiontów *S. scoparius*, ale nie szczepu *Bradyrhizobium (Lupinus)* D1. Fagi reprezentujące drugą grupę ( $\phi$ D1 i  $\phi$ T1) infekowały 11 z 30 bakterii specyficznych dla żarnowca miotlastego oraz szczep referencyjny *Bradyrhizobium (Lupinus)* D1. Aktywność lityczna dwóch ostatnich fagów w stosunku do szczepu *Bradyrhizobium (Lupinus)* D1 potwierdziła bliskie pokrewieństwo pomiędzy szczepami wyizolowanymi z brodawek korzeniowych *Sarothamnus scoparius* i *Lupinus* sp.

stwierdzone wcześniej na podstawie analizy numerycznej i analizy sekwencji nukleotydowej genu *nodC*.

Zastosowanie mikroskopii elektronowej pozwoliło na określenie budowy morfologicznej wirusów specyficznych dla mikrosymbiontów *S. scoparius*. Stwierdzono również, że badane wirusy reprezentują dwie rodziny: *Myoviridae* i *Siphoviridae*, zgodnie z klasyfikacją Bradley'a. Bakteriofagi  $\phi$ D1 i  $\phi$ T1, należące do rodziny *Siphoviridae*, miały wydłużoną główkę i długi, niekurczliwy ogonek. Natomiast dwa pozostałe wirusy, tj.  $\phi$ CYT21 i  $\phi$ OS6, reprezentujące rodzinę *Myoviridae*, charakteryzowały się obecnością ikosaedralnej główki i długiego, kurczliwego ogonka.

Zastosowanie enzymów restrykcyjnych *EcoRI* i *HindIII* umożliwiło określenie wielkości genomowego DNA badanych wirusów bakteryjnych, która mieściła się w zakresie od 47,583 do 60,098 pz.

**P2.** Mierzwa B., **Wdowiak-Wróbel S.**, Małek W., **2009.** Phenotypic, genomic and phylogenetic characteristics of rhizobia isolated from root nodules of *Robinia pseudoacacia* (black locust) growing in Poland and Japan, *Archives of Microbiology*, 191, 697-710. (IF–1.927; MNiSW-15 pkt)

**P3.** Małek W., **Wdowiak-Wróbel S.**, Bartosik M., Konopa G, Narajczyk M., **2009.** Characterization of phages virulent for *Robinia pseudoacacia* rhizobia, *Current Microbiology*, 59:187-92. (IF–1.33; MNiSW-10 pkt)

**P4.** Mierzwa B, **Wdowiak-Wróbel S.**, Małek W., **2010.** *Robinia pseudoacacia* in Poland and Japan is nodulated by *Mesorhizobium amorphae* strains, *Antonie van Leeuwenhoek*, 97, 351-361. (IF–1.673; MNiSW-20 pkt)

**P5.** Mierzwa B., **Wdowiak-Wróbel S.**, Kalita M., Gnat S., Malek W., **2010.** Insight into the evolutionary history of symbiotic genes of *Robinia pseudoacacia* rhizobia deriving from Poland and Japan, *Archives of Microbiology*, 192, 341-350. (IF–1.754; MNiSW-20 pkt)

Moje prace badawcze miały na celu określenie właściwości fenotypowych, genomowych i ustalenie relacji filogenetycznych mikrosymbiontów, dziko rosnącej

rośliny bobowatej - *Robinia pseudoacacia* (robinia akacyjowa, grochodrzew biały), pochodzących z Polski i Japonii. Analiza numeryczna 102 cech fenotypowych, 40 izolatów z brodawek korzeniowych robinii akacyjowej, wykazała, że tworzą one wspólną grupę z przedstawicielami bakterii rodzaju *Mesorhizobium*. W celu ustalenia pozycji rodzajowej badanych bakterii wykonano analizę porównawczą sekwencji nukleotydowych genu 16S rRNA, wybranych mikrosymbiontów *R. pseudoacacia* i odpowiednich sekwencji nukleotydowych szczepów referencyjnych. Stopień podobieństwa sekwencji genu 16S rRNA izolatów robinii akacyjowej między sobą wyniósł 99%. Jednocześnie sekwencje te wykazały największe podobieństwo do sekwencji genu 16S rRNA przedstawicieli rodzaju *Mesorhizobium* (98-99%).

Zastosowanie techniki AFLP umożliwiło określenie zróżnicowania genomowego w obrębie badanej grupy izolatów. Uzyskane wyniki wykazały duży polimorfizm genomy symbiontów *R. pseudoacacia*, co wskazuje, że metoda ta może być wykorzystana do szybkiej identyfikacji mikrosymbiontów grochodrzewu białego.

Analiza profili plazmidowych ujawniła obecność pozachromosomalnego DNA u 16 mikrosymbiontów *R. pseudoacacia*. Czternaście z nich charakteryzowało się obecnością jednego plazmidu o wielkości od 771 do 961 kpz, podczas gdy dwa pozostałe szczepy dodatkowo posiadały 1 lub 2 mniejsze plazmidy. Hybrydyzacja DNA:DNA metodą Southern'a z sondą dla genu *nifH* wykazała, że geny symbiotyczne u ryzobiów specyficznych dla grochodrzewu białego są zlokalizowane na megaplazmidzie (**publikacja P2**).

Bakteriofagi mogą być wykorzystywane, jako narzędzie przy typowaniu i różnicowaniu szczepów bakteryjnych. Z ryzosfery rośliny bobowatej *R. pseudoacacia* wyizolowano 3 lityczne bakteriofagi, tj.  $\phi$ RP1,  $\phi$ RO2 i  $\phi$ RP3. Badane fagi były zdolne do infekcji nie tylko mikrosymbiontów *R. pseudoacacia* (ok. 50% przebadanych szczepów), ale także 8 gatunków bakterii reprezentujących rodzaj *Mesorhizobium*. Stopień adsorpcji cząstek fagowych do komórek bakterii specyficznych dla grochodrzewu białego mieścił się w zakresie od 70.4% do 93.94%. Zastosowanie mikroskopu elektronowego wykazało, że badane wirusy bakteryjne charakteryzują się obecnością wydłużonej główki oraz długiego, niekurczliwego ogonka i reprezentują, pod względem morfologicznym, rodzinę *Siphoviridae* wg. klasyfikacji Bradley'a. Użycie enzymów restrykcyjnych *HindII* i *HindIII* umożliwiło określenie wielkości genomów bakteriofagów:  $\phi$ RP1,  $\phi$ RO2 i  $\phi$ RP3. Stwierdzono, że ich wielkość mieściła się w zakresie od ok. 82 do 103 kpz (**publikacja P3**).

W analizie porównawczej sekwencji nukleotydowych genów *atpD*, *dnaK* oraz analizie długości fragmentów restrykcyjnych 16S rDNA (RFLP-16S rDNA) ustalono pozycję rodzajową mikrosymbiontów *R. pseudoacacia*. Badane izolaty wykazały największy stopień podobieństwa sekwencji genu *dnaK* i *atpD* do analogicznych genów bakterii rodzaju *Mesorhizobium* (odpowiednio 91-98% oraz 90-98%). Pozycja rodzajowa potwierdzona została również analizą restrykcyjną 16S rDNA, w której wykorzystano szczepy referencyjne rodzaju *Mesorhizobium*.

W celu określenia pozycji gatunkowej izolatów z grochodrzewu białego zastosowano metodę hybrydyzacji DNA:DNA. DNA mikrosymbiontów *R. pseudoacacia* wykazało największy stopień hybrydyzacji z DNA *Mesorhizobium amorphae* (51-75%). W przypadku pozostałych gatunków rodzaju *Mesorhizobium* użytych w badaniu stopień reasocjacji DNA:DNA był niższy niż 41%. Wyniki analizy numerycznej, genomowej i filogenetycznej pozwoliły na sklasyfikowanie bakterii specyficznych dla robinii akacjowej do gatunku *M. amorphae* (**publikacja P4**).

W oparciu o analizę sekwencji nukleotydowych genów symbiotycznych *nodA* i *nodC*, ustalono symbiotyczne pokrewieństwo izolatów z brodawek korzeniowych *R. pseudoacacia* z bakteriami reprezentującymi mikrosymbionty *Phaseolus* sp. oraz gatunkiem *Mesorhizobium amorphae*. Filogeneza genu *nifH* bakterii specyficznych dla grochodrzewu białego była zgodna z historią ewolucyjną genu 16S rRNA. Na drzewie filogenetycznym genu *nifH* badane izolaty tworzyły wspólne grono z bakteriami reprezentującymi rodzaj *Mesorhizobium*. Obecność genu *nodH*, który koduje enzym sulfotransferazę w genomie mikrosymbiontów *R. pseudoacacia*, może sugerować, że bakterie te produkują specyficzne, sulfonowane czynniki Nod niezbędne w symbiotycznych interakcjach z gospodarzem roślinnym.

Spośród 14 badanych roślin, mikrosymbionty grochodrzewu białego tworzyły efektywne układy symbiotyczne jedynie z przedstawicielami rodzaju *Amorpha* sp. (*Amorpha fruticosa* i *Amorpha californica*) oraz własnym gospodarzem *R. pseudoacacia*. Analiza brodawek korzeniowych *R. pseudoacacia*, przy użyciu mikroskopu świetlnego i elektronowego, wykazała, że są to brodawki niezidentyfikowane (**publikacja P5**).

**P6.** Gnat S., Wójcik M., **Wdowiak-Wróbel S.**, Kalita M., Ptaszyńska A., Małek W., **2014.** Phenotypic characterization of *Astragalus glycyphyllos* symbionts and their

phylogeny based on the 16S rDNA sequences and RFLP of 16S rRNA gene, *Antonie van Leeuwenhoek*, 105, 1033-48. (IF–1.806; MNiSW-20 pkt)

**P7.** Gnat S., Małek W., Oleńska E., Trościańczyk A., **Wdowiak Wróbel S.**, Michał Kalita, Wójcik M., **2015.** Insight into the genomic diversity and relationship of *Astragalus glycyphyllos* symbionts by RAPD, ERIC-PCR, and AFLP fingerprinting, *Journal of Applied Genetics*, 56, 551-554. (IF–1.929; MNiSW-20 pkt)

**P8.** Gnat S., Małek, Oleńska E., **Wdowiak Wróbel S.**, Kalita M., Łotocka B., Wójcik M., **2015.** Phylogeny of symbiotic genes and the symbiotic properties of rhizobia specific to *Astragalus glycyphyllos* L, *PLoS ONE* 10(10):e0141504. (IF–3.234; MNiSW-40 pkt)

**P9.** Gnat S., Małek W., Oleńska E., **Wdowiak-Wróbel S.**, Kalita M., Rogalski J., Wójcik M., **2016.** Multilocus sequence analysis supports taxonomic position of *Astragalus glycyphyllos* symbionts based on DNA:DNA hybridization, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 1906-1912. doi: 10.1099/ijsem.0.000862. (IF–2.511; MNiSW-40 pkt)

Na podstawie analizy numerycznej 86 cech fenotypowych mikrosymbiontów *Astragalus glycyphyllos* (traganek szerokolistny) uzyskano drzewo, na którym badane szczepy utworzyły wspólne grono ze szczepami rodzaju *Mesorhizobium*, przy współczynniku podobieństwa wynoszącym 75%. W celu określenia pozycji taksonomicznej i relacji filogenetycznych mikrosymbiontów traganek szerokolistnego do innych ryzobiów wykonano analizę porównawczą sekwencji nukleotydowych genu 16S rRNA. Na drzewie filogenetycznym badane izolaty utworzyły wspólną grupę z bakteriami rodzaju *Mesorhizobium* (95-99% podobieństwo sekwencji 16S rDNA). Jednocześnie stwierdzono, że utworzyły one dwie podgrupy. Jedna obejmowała gatunki *Mesorhizobium tianshanense*, *Mesorhizobium temperatum*, *Mesorhizobium mediterraneum*, *Mesorhizobium chacoense*, *Mesorhizobium ciceri* oraz 6 izolatów z brodawek korzeniowych *A. glycyphyllos* (AG1, AG5, AG7, AG9, AG15, AG27). Do drugiej należały 4 szczepy traganekowe (AG12, AG16, AG17, AG22) oraz *Mesorhizobium amorphae*, *Mesorhizobium septentrionale*, *Mesorhizobium loti*, *Mesorhizobium huakuii*, *Mesorhizobium plurifarum*. Przynależność bakterii

specyficznych dla *A. glycyphyllos* do rodzaju *Mesorhizobium* potwierdzono w oparciu analizę fragmentów restrykcyjnych 16S rDNA (RFLP-16S rDNA).

Zastosowanie technik RAPD, ERIC-PCR i AFLP umożliwiło określenie zróżnicowania genomowego izolatów z brodawek korzeniowych *A. glycyphyllos*. Wykazano, że wszystkie zastosowane metody mają porównywalny zakres genomowego różnicowania ryzobiów specyficznych dla traganka szerokolistnego i mogą być stosowane do identyfikacji i różnicowania tych bakterii (**publikacja P6 i P7**).

Analiza porównawcza sekwencji nukleotydowych 5 genów rdzeniowych (*atpD*, *dnaK*, *glnA*, *recA*, *rpoB*) mikrosymbiontów *A. glycyphyllos* umożliwiła ustalenie ich pozycji taksonomicznej oraz określenie relacji filogenetycznych z innymi przedstawicielami ryzobiów. Na drzewach filogenetycznych dla genów *atpD*, *dnaK*, *glnA*, *recA* i *rpoB* mikrosymbionty traganka szerokolistnego utworzyły monofiletyczną grupę z bakteriami rodzaju *Mesorhizobium*. Cztery szczepy (AG1, AG7, AG15 i AG27) charakteryzowały się największym podobieństwem badanych sekwencji do sekwencji genów metabolizmu podstawowego *Mesorhizobium ciceri*. Pozostałe dwa izolaty (AG17, AG22) utworzyły wspólną podgrupę z bakteriami reprezentującymi gatunki *M. amorphae* i *M. septentrionalae*, wyjątek stanowił szczep AG22 dla genu *recA*.

W oparciu o wyniki hybrydyzacji DNA:DNA cztery badane izolaty (AG1, AG7, AG15 i AG27) zostały sklasyfikowane do gatunku *M. ciceri* (76.4 - 84.2% stopień hybrydyzacji DNA), natomiast dwa pozostałe szczepy (AG17 i AG22) włączono do gatunku *M. amorphae* (77.5-80.1% stopień hybrydyzacji DNA) (**publikacja P9**).

Na drzewach filogenetycznych genów *nodA*, *nodC*, *nodH* i *nifH* badane izolaty tworzyły wspólną grupę z bakteriami rodzaju *Mesorhizobium* (99–100% podobieństwa sekwencji genów *nodAC* i *nifH*, oraz 98–99% genu *nodH*). Wykazały przy tym największe pokrewieństwo filogenetyczne genów symbiotycznych z analogicznymi genami *M. ciceri* sv. *biserrulae*, *M. opportunistum* sv. *biserrulae* i *M. australicum* sv. *biserrulae*. Uzyskane rezultaty analizy porównawczej sekwencji nukleotydowych genów *nodA* i *nodC* pozwoliły na sklasyfikowanie izolatów z *A. glycyphyllos* do nowego symbiowaru „*glycyphyllae*”.

Zawartość G+C w genomie badanych ryzobiów wyniosła od 59.39mol% do 62.11mol% i mieściła się w zakresie ustalonym dla bakterii rodzaju *Mesorhizobium*.



Spośród 11 przebadanych gatunków roślin bobowatych mikrosymbionty *A. glycyphyllos* wchodziły w efektywne układy symbiotyczne jedynie z własnym gospodarzem oraz *Amorpha fruticosa*, co świadczy o ich wąskim zakresie gospodarza roślinnego. Analiza przy użyciu mikroskopu świetlnego i elektronowego ujawniła, że badane szczepy indukowały na korzeniach *A. glycyphyllos* brodawki typu niezdeteminowanego (**publikacja P8**).

**P10.** Kalita M., Palusińska-Szyszk M., Turska-Szewczuk A., **Wdowiak-Wróbel S.**, Urbanik-Sypniewska T., **2013.** Isolation of cultivable microorganisms from Polish notes and coins, *Polish Journal of Microbiology*, 62, 281-286. (**IF-0.871; MNiSW-15 pkt**)

Uczestniczyłam w badaniach dotyczących określenia czystości mikrobiologicznej polskich monet i banknotów. Wyizolowane z tych materiałów bakterie były identyfikowane w oparciu o cechy fenotypowe (fizjologiczne i biochemiczne), a także analizę sekwencji genu 16S rRNA. Wśród wyizolowanych szczepów przewagę stanowiły bakterie rodzaju: *Enterococcus* i *Staphylococcus*. Identyfikacja grzybów oparta była na ich cechach morfologicznych i właściwościach biochemicznych. Przeprowadzone badania ujawniły obecność grzybów rodzaju: *Aspergillus* i *Penicillium* oraz drożdżaka *Candida*. Uzyskane wyniki analizy czystości mikrobiologicznej polskich monet i banknotów wykazały obecność mikroorganizmów wchodzących w skład naturalnej mikroflory człowieka. Jedynie w kilku przypadkach wykazano obecność bakterii gatunków: *Escherichia coli*, *Pseudomonas stutzeri*.

**P11.** Marek-Kozaczuk M., Leszcz A., Wielbo J, **Wdowiak-Wróbel S.**, Skorupska A., **2013.** *Rhizobium pisi* K3.22 harboring *nod* genes cluster of *Rhizobium leguminosarum* sv. *trifolii*, *Systematic and Applied Microbiology*, 36, 252-258. (**IF-3.31; MNiSW-35 pkt**)

W oparciu o analizę sekwencji nukleotydowej genu 16S rRNA ustalono pozycję rodzajową szczepu K3.22, wyizolowanego z brodawek korzeniowych koniczyny czerwonej (*Trifolium pratense* L. cv. Dajana). Stwierdzono, że wykazuje on największe podobieństwo sekwencji 16S rDNA do sekwencji tego genu bakterii rodzaju *Rhizobium*. Jednocześnie sekwencja genu 16S rRNA szczepu K3.22 była w

100% identyczna z sekwencją referencyjnego szczepu *Rhizobium pisi* DSM 30132. Wielolokusowa analiza porównawcza sekwencji 6 genów metabolizmu podstawowego (*atpD*, *dnaK*, *glnA*, *gyrB*, *rpoB* i *recA*) potwierdziła taksonomiczną pozycję badanego mikrosymbionta koniczyny czerwonej, co pozwoliło na zaklasyfikowanie tego izolatu do gatunku *Rhizobium pisi*.

W oparciu o analizę sekwencji nukleotydowych genów *nodA*, *nodB*, *nodC* i *nodD* *R. pisi* DSM 30132 i szczepu K3.22 ustalona została historia ewolucyjna genów symbiotycznych tych bakterii. Na filogramach tych genów badane szczepy utworzyły odrębne monofiletyczne grupy. *R. pisi* DSM 30132 utworzył wspólne grono z bakteriami reprezentującymi gatunki *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae* i *Rhizobium fabae*. Natomiast izolat K3.22 zgrupował się ze szczepami *Rhizobium leguminosarum* sv. *trifolii*. Uzyskane wyniki wskazują, że geny symbiotyczne mikrosymbionta K3.22 zostały nabyte na drodze transferu genów od szczepu *R. leguminosarum* sv. *trifolii*. Badania dotyczące zakresu gospodarza roślinnego szczepów K3.22 i *R. pisi* DSM 30132 ujawniły różnice specyficzności procesu brodawkowania. Izolat K3.22 tworzył efektywne układy symbiotyczne z dwiema odmianami koniczyny (białą i czerwoną), grochem i niektórymi odmianami fasoli. Nie był natomiast zdolny do wchodzenia w symbiozę z wyką. W przypadku *R. pisi* DSM 30132 stwierdzono efektywne w wiązaniu azotu brodawki na wyce, grochu i wszystkich badanych odmianach fasoli. Szczep ten nie tworzył lub tworzył pseudobrodawki na białej i czerwonej koniczynie.

Analiza cech fenotypowych K3.22 i *R. pisi* DSM 30132 wykazała niewielkie różnice właściwości metabolicznych i tolerancji na antybiotyki u badanych szczepów. Na podstawie uzyskanych rezultatów izolat z koniczyny czerwonej został sklasyfikowany do gatunku *R. pisi*. Jednocześnie w oparciu o analizę sekwencji nukleotydowych genów symbiotycznych zaliczono go do nowego symbiowaru „*trifolii*”.

**P12.** Palusinska-Szys M., Zdybicka-Barabas A., Cytryńska M., **Wdowiak-Wróbel S.**, Chmiel E., Gruszecki W.I., **2015.** Analysis of cell surface alterations in *Legionella pneumophila* cells treated with human apolipoprotein E, *Pathogens and Disease*, 73, 1-8. (IF–2.403; MNiSW-25 pkt)

Badania dotyczyły zdolności ludzkiej apolipoproteiny E (apoE) do interakcji z komórkami *Legionella pneumophila*. Ludzka apoE odpowiada między innymi: za

regulację funkcji płytek krwi, apoptozę, stres oksydacyjny, a także uczestniczy w modulowaniu odpowiedzi zapalnej. Występuje ona w trzech izoformach – apoE2, apoE3 i apoE4. W badaniach wykorzystano izoformę 4 apolipoproteiny E. Jest ona głównym genetycznym czynnikiem ryzyka wystąpienia choroby Alzheimera oraz sprzyja rozwojowi arteriosklerozy. Stwierdzono również, że apoE4 bierze udział w indukcji cytokin prozapalnych (IL-6 oraz TNF- $\alpha$ ), odpowiedzialnych za reakcję na zakażenie bakteriami rodzaju *Legionella*. Przy zastosowaniu metody SDS-PAGE wykazano, że apoE może wchodzić w interakcje z LPS *L. pneumophila*. Technika FTIR ujawniła, że interakcja ta może zachodzić na skutek oddziaływań estrowej grupy karbonylowej lipopolisacharydu *L. pneumophila* z apoE4. Wykorzystanie mikroskopii sił atomowych (AFM) wykazało, że w wyniku interakcji LPS z apoE4 dochodzi do zmian topografii powierzchni komórki i właściwości mechanicznych komórek *L. pneumophila*. Zmiany wywołane przez apoE4 prawdopodobnie utrudniają wnikanie patogenu do komórek gospodarza.

### Prace przeglądowe

**P13.** Małek W., **Wdowiak-Wróbel S.**, Kalita M., Świecicka I., Studzińska B., **2005.** W poszukiwaniu koncepcji gatunku bakteryjnego, *Postępy Mikrobiologii*, 44, 323-328. **(IF–brak; MNiSW-4 pkt)**

**P14.** Małek W., **Wdowiak-Wróbel S.**, Kalita M., Szlachetka M., **2008.** Dylematy z koncepcją i definicją gatunku bakteryjnego, *Postępy Mikrobiologii*, 47, 177-182. **(IF–brak; MNiSW-4 pkt)**

**P15.** Małek W., **Wdowiak-Wróbel S.**, Kalita M., Studzińska B., Szlachetka M., Bartoszcze M., Gryko R., **2007.** Wyspy patogenności, *Medycyna Weterynaryjna*, 63, 1026-1029. **(IF–0.18; MNiSW-10 pkt)**

### Plany na przyszłość

W najbliższym czasie moje badania naukowe będą skupiały się na uzyskaniu mutantów w genie *acdS* i porównaniu właściwości promujących wzrost i rozwój roślin u szczepów dzikich i mutantów w układach symbiotycznych z roślinami. Pozwolą one na zbadanie wpływu enzymu - ACC deaminazy na wzrost i rozwój roślin w warunkach stresowych.

Dodatkowo planuję badania dotyczące bioróżnorodności genetycznej i właściwości promujących wzrost i rozwój roślin, izolatów z brodawek korzeniowych roślin chronionych pochodzących z terenów kserotermicznych południowo-wschodniej Polski. W przyszłości, badane szczepy mogą być wykorzystane jako szczepionki bakteryjne wpływające korzystnie na rozwój roślin chronionych lub zagrożonych.

Planuję również rozszerzenie badań na bakterie endofityczne, takie jak *Methylobacterium*, *Ochrobactrum*, czy *Pantoea*, które zostały pozyskane w trakcie izolacji szczepów ryzobiowych z brodawek roślin chronionych.

## 6. Podsumowanie

- Mój dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje współautorstwo w **18 pracach oryginalnych** opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie JCR. Jestem współautorem **4 prac przeglądowych** oraz **33 komunikatów konferencyjnych**. Na konferencjach międzynarodowych było prezentowane 14 komunikatów.
- Łączny IF siedmiu prac włączonych do osiągnięcia naukowego wynosi **9,682**, a suma punktów **MNiSW: 135**. Sumaryczny IF prac wynosi **38,27**, a suma punktów **MNiSW 461**. Wg bazy Web of Science (WOS) prace były cytowane **42** razy (bez autocytowań).
- W ramach działalności naukowej byłam wykonawcą lub głównym wykonawcą w pięciu zrealizowanych projektach badawczych finansowanych przez MNiSW i NCN oraz kierownikiem i głównym wykonawcą grantu przyznanego przez Prorektora UMCS d/s Badań i Współpracy Międzynarodowej (zał. 3.II.I).
- Wykonałam dwie ekspertyzy na zamówienie (w jednej byłam wykonawcą, w drugiej kierownikiem).
- Współpracowałam z naukowcami z krajowych ośrodków badawczych, które zaowocowały publikacjami.
- Wykonałam recenzje manuskryptów prac dla redakcji czasopism naukowych: Polish Journal of Microbiology oraz Symbiosis (7 recenzji).

**Podsumowanie pracy dydaktycznej, organizacyjnej i działalności popularyzatorskiej**

W ramach zajęć dydaktycznych prowadziłam ćwiczenia z mikrobiologii, mikrobiologii lekarskiej dla studentów biologii, biotechnologii, ćwiczenia dla studentów chemii środków bioaktywnych i kosmetyków, a także zajęcia mikrobiologia z genetyką dla studentów studiów podyplomowych. Prowadzę również zajęcia z mikrobiologii i mikrobiologii lekarskiej dla studentów z programu Erasmus. Uczestniczyłam w przygotowaniu programów zajęć i skryptu do zajęć z mikrobiologii i mikrobiologii lekarskiej.

Odpowiadam za planowanie badań i uczestniczę w pracach doświadczalnych studentów mikrobiologii i biotechnologii w ramach zajęć pracowni specjalizacyjnej i magisterskiej. Byłam opiekunem naukowym studentów wykonujących eksperymenty do prac magisterskich (18), promotorem (12) i recenzentem prac licencjackich (18). Byłam opiekunem roku studentów kierunku biotechnologia. Jestem egzaminatorem Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej dla doboru studentów na I rok II<sup>o</sup> studiów dla kierunku biotechnologia.

Brałam czynny udział w wydarzeniach promujących UMCS i popularyzujących uczelnię, takich jak: V Lubelski Festiwal Nauki, Dni Drzwi Otwartych Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS oraz Nocy Biologów. Brałam udział i wchodziłam w skład komitetu organizacyjnego Polskiego Kongresu Genetyki w 2010 roku. Pełnię funkcję sekretarza Polskiego Towarzystwa Genetycznego Oddział w Lublinie i biorę udział w organizacji spotkań naukowych pod patronatem PTG.

Hobanif Wrobel