

dr hab. Zbigniew Kaczyński, prof. UG

Gdańsk, dnia 20.05.2019 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Pac-Sosińskiej pt. „Charakterystyka antygenów O, glukanów i egzopolisacharydów bakterii z rodzaju *Ochrobactrum*”

Praca doktorska została przygotowana pod opieką promotora prof. dr. hab. Adama Chomy w Zakładzie Mikrobiologii i Genetyki, Instytutu Mikrobiologii i Biotechnologii, Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

Azot jest jednym z głównych pierwiastków, z którego zbudowane są białka i kwasy nukleinowe, ale również niezliczona liczba związków, niezbędnych do funkcjonowania żywych organizmów. Brak biologicznie dostępnego azotu w glebie praktycznie zawsze przekłada się na znaczące obniżenie plonów. Stosowanie nawozów syntetycznych jest jednak kosztowne, a w dłuższej perspektywie negatywnie wpływa na środowisko. Dlatego też bardzo dużo uwagi poświęca się procesowi biologicznego wiązania azotu, polegającemu na przekształceniu azotu atmosferycznego do przyswajalnych przez rośliny jonów amonowych. Mikroorganizmy zdolne do redukcji wolnego azotu nazywane są diazotrofami i przynależą do trzech typów: Bakterie właściwe, Promieniowce oraz Sinice. Wśród bakterii można wyróżnić bakterie wolno żyjące (np. z rodzaju *Azotobacter*, *Azospirillum*) oraz bakterie brodawkowate (np. z rodzaju *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Phyllobacterium*, *Azorhizobium*, *Ochrobactrum*) wiążące azot atmosferyczny w symbiozie z roślinami bobowatymi. Rozwinięcie symbiozy pomiędzy bakteriami, a roślinami charakteryzuje się wysoką specyficznością. W złożonym procesie wzajemnego rozpoznawania symbiontów istotną rolę odgrywają struktury znajdujące się na powierzchni korzeni roślin i na powierzchni ściany komórkowej bakterii. Jednymi z najbardziej wyeksponowanych elementów ściany komórkowej bakterii są lipopolisacharydy (LPS-y) oraz egzopolisacharydy (EPS-y). Znajomość ich struktur chemicznych pozwala zrozumieć i wyjaśnić część mechanizmów oddziaływań bakterie brodawkowate/rośliny bobowate. W tę tematykę bardzo dobrze wpisują się badania przedstawione w pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Pac-Sosińskiej, poświęconej charakterystyce antygenów O, glukanów i egzopolisacharydów bakterii z rodzaju *Ochrobactrum*.

Rozprawa doktorska, licząca aż 192 strony, została podzielona na 9 numerowanych rozdziałów, których układ i zawartość są typowe dla tego typu pracy.

Praca rozpoczyna się od streszczeń w języku polskim i angielskim, które dobrze opisują zawartość rozprawy doktorskiej.

Pierwszym numerowanym rozdziałem jest *Wstęp*. Tytuł ten jest moim zdaniem trochę mylący, ponieważ sugeruje krótkie wprowadzenie do tematyki rozprawy doktorskiej, a w rzeczywistości jest liczącym aż 75 stron jej obszernym fragmentem, składającym się z trzech części (*Wprowadzenie*, *Symbioza roślin motylkowatych z Rhizobiaceae*, oraz *Bakteryjne polisacharydy powierzchniowe*) w którym Doktorantka szczegółowo opisuje m.in.:

- wiązanie azotu cząsteczkowego,
- roślinnych partnerów symbiozy,
- bakterie brodawkowate (w tym rodzaju *Ochrobactrum*),
- mechanizm wiązania azotu,
- rodzaje brodawek korzeniowych,
- czynniki wpływające na przebieg symbiozy,
- lipopolisacharydy,
- peryplazmatyczne β -glukany,
- polisacharydy kapsularne.

Wszystkie podrozdziały napisane są przystępnie i poparte licznymi odnośnikami literaturowymi. Należy również podkreślić, iż tematyka poruszona we *Wstępie* jest ściśle związana z badaniami opisanymi w dalszych częściach rozprawy doktorskiej. Moim zdaniem trochę brakuje rozdziału poświęconego technikom wykorzystywanym do określania struktury chemicznej badanych polisacharydów, oczywiście przy jednoczesnym skróceniu opisu ww. zagadnień.

Doktorantka za cel badań postawiła sobie określenie struktury chemicznej łańcuchów O-swoistych i glukanów oraz scharakteryzowanie egzopolisacharydów (zdolność sorpcyjna w stosunku do jonów ołowiu oraz kadmu) syntezowanych przez wiążące azot atmosferyczny symbiotyczne szczepy bakterii *Ochrobactrum cytisi* ESC1^T i *Ochrobactrum lupini* LUP21^T.

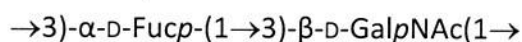
W liczącym 13 stron rozdziale *Materiały i metody* Doktorantka wymienia materiały wykorzystane podczas prowadzenia badań oraz dosyć szczegółowo opisuje wszystkie przeprowadzone analizy.

Liczący 55 stron rozdział *Wyniki* składa się z 3 części, w których Kandydatka do stopnia doktora opisuje wyniki badań strukturalnych OPS-ów, peryplazmatycznych glukanów oraz egzopolisacharydów wyizolowanych ze szczepów bakterii *Ochrobactrum cytisi* ESC1^T i *Ochrobactrum lupini* LUP21^T. Do określenia struktury badanych molekuł Doktorantka wykorzystwała klasyczne metody chemiczne (analiza cukrowa, analiza metylacyjna, analiza składu kwasów tłuszczowych, przyporządkowanie monosacharydów do szeregu konfiguracyjnego D lub L) oraz spektroskopowe (NMR, MS i GC-MS).

1. LPS-y

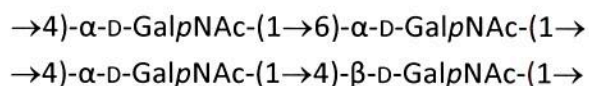
Wyniki analizy metodą SDS-PAGE wykazały, iż LPS szczepu *Ochrobactrum cytisi* ESC1^T występują w trzech formach LPS-R, LPS-R/S i LPS-S, natomiast LPS szczepu *Ochrobactrum lupini* LUP21^T występują głównie w formie LPS-S.

Analiza chemiczna LPS-u ze szczepu *Ochrobactrum cytisi* ESC1^T wykazała dominujący udział monosacharydów: α -D-fukozy i β -D-galaktozaminy oraz kwasów tłuszczowych 3-OH-16:0 i 27-OH-28:0. Zaproponowana na podstawie wyników analiz chemicznych oraz spektroskopowych jednostka powtarzalna OPS-u jest disacharydem o strukturze:



Stwierdzono również, iż ok. 20 % reszt GalN jest podstawiona grupą O-Me w pozycji C-4 lub resztą pirogronową w pozycjach C-4 i C-6.

Analiza chemiczna LPS ze szczepu *Ochrobactrum lupini* LUP21^T wykazała dominujący udział monosacharydów D-*altro*-heptulozy i N-acetylo-D-galaktozaminy oraz kwasów tłuszczowych 3-OH-16:0 i 27-OH-28:0. Na podstawie wyników analiz chemicznych oraz spektroskopowych zaproponowano obecność dwóch różnych OPS-ów zbudowanych z N-acetylo-D-galaktozaminy, których strukturę jednostek powtarzalnych można przedstawić jako:



Stwierdzono również, iż oba OPS-y są podstawione resztami D-*altro*-heptulozy, której miejsca przyłączenia niestety nie udało się ustalić.

2. Peryplazmatyczne glukany

Peryplazmatyczne glukany wyizolowane z obu szczepów bakterii zbudowane są z β-glukozy połączonej wiązaniami glikozydowymi (1→2). Przy czym dla szczepu *Ochrobactrum cytisi* ESC1^T jedna cząsteczka glukanu zawiera 17-28 reszt glukozy (najczęściej 19-22), natomiast dla szczepu *Ochrobactrum lupini* LUP21^T – 17-27 reszt glukozy (najczęściej 19-22).

3. Egzopolisacharydy

Wyizolowane z obu szczepów egzopolisacharydy zbudowane są z reszt mannozy, glukozy oraz galaktozy o różnych proporcjach ilościowych. Niestety ze względu na ich dużą masę cząsteczkową nie udało się zarejestrować widm NMR o odpowiedniej jakości, które umożliwiłyby określenie struktury chemicznej obu egzopolisacharydów.

EPS-y mogą być wykorzystywane do sorpcji metali ciężkich. Stwierdzono, iż szczep *Ochrobactrum lupini* LUP21^T produkuje bardzo duże ilości EPS, dlatego też wybrano go do badania zdolności sorpcyjnej jonów kadmu i ołowiu, a także jej zależności od stężenia metali i pH środowiska. Stwierdzono również iż stężenie jonów kadmu ok. 10 mg/L powoduje praktycznie całkowite zahamowanie wzrostu bakterii, natomiast przy stężeniu ołowiu ok. 80 mg/L ciągle obserwowano wzrost bakterii.

Bardzo ważnym rozdziałem w rozprawie jest *Dyskusja*, w którym Doktorantka wyniki swoich badań porównuje z doniesieniami literaturowymi. Po przeczytaniu tego rozdziału można stwierdzić, iż postawione w pracy doktorskiej cele zostały zrealizowane. Choć pozostaje pewien niedosyt, że nie udało się określić struktury chemicznej egzopolisacharydów wyizolowanych z obu badanych szczepów bakterii, a także określić miejsca i sposobu przyłączenia reszt D-*altro*-heptulozy w OPS-ie otrzymanym z LPS-u bakterii *Ochrobactrum lupini* LUP21^T.

Rozdziały (VI-IX) zawierają krótkie podsumowanie przeprowadzonych badań, zestawienie wykorzystanej literatury, wykaz skrótów oraz spis rycin i tabel. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż Doktorantka wykorzystwała aż 343 odnośniki literaturowe, zamieściła również 79 rycin oraz 23 tabele.

Pracę przeczytałem z przyjemnością. Jest ona napisana dosyć logicznie, poprawnie gramatycznie, a formatowanie tekstu jest bardzo dobre. Jednak przy tak obszernym opracowaniu trudno jest ustrzec się niedociągnięć. Poniżej przedstawiam kilka wybranych uwag.

- W rozdziałach *Wyniki* i *Dyskusja* brakuje mi formy osobowej. Wszędzie jest napisane otrzymano, wyhodowano, rozdzielono, analizowano itp.. Nie pozostaje mi nic innego, jak założyć, iż wszystkie eksperymenty, a następnie interpretacja wyników zostały przeprowadzone przez Doktorantkę...
- Na czym polegała „destylacja z 5 % kwasu octowego z metanolu” (s.94).
- Co oznacza sformułowanie „nadmiar borodeuterku usunięto przy użyciu kilku kropel kwasu octowego” (s.95),
- Czym się różni „chromatografia gazowa” od „chromatografii gazowo-cieczowej” (s.97),
- Czym podyktowane było wykorzystanie różnych rozpuszczalników (D₂O lub DMSO) do przygotowania próbek polisacharydów peryplazmatycznych do pomiaru widm NMR (s.99)?
- Jak została wyliczona % wydajność ekstrakcji w tabeli 8? Czy nie jest 10 x za duża?
- Czy ścieżki na Ryc. 31 odpowiadają stężeniom podanym w opisie? (jest 2, 5, 10, czy nie powinno być 10, 5, 2).
- „Analiza składu węglowodanowego preparatu *O. lupini* LUP21T wykazała, że w największej ilości, występuje galaktozamina”. Wydaje się, iż na podstawie tab. 10 można stwierdzić, że więcej jest heptulozy (s.105).
- Dlaczego polisacharyd otrzymany po hydrolizie LPS za pomocą 1 % kwasu octowego nazwany został „degradowanym polisacharydem” (dgPS; s.110).
- Jaki był cel doczyszczania frakcji B (ryc. 37), skoro „doczyszczony” materiał nie był poddany praktycznie żadnej analizie?
- Jak należy rozumieć stwierdzenie: „Podczas interpretacji widm GC-MS jesteśmy w stanie określić pozycję wiązań glikozydowych pomiędzy poszczególnymi monomerami w oligosacharydach degradowanego polisacharydu” (s.112).
- Co to są „odpowiednie sygnały” w odniesieniu do opisanej integracji (s.119).
- Co oznacza stwierdzenie „podjednostka cukrowa”, a co „podjednostka monocukrowa” (s.126, s.127).
- Jaka jest zależność pomiędzy multipletością, a konfiguracją anomeryczną? „Sygnały oznaczone literami A, B, C są szerokimi singletami zaś sygnał D to dublet. Tak więc monocukry A, B, C to α anomery, a D jest β anomerem.” (s.126).
- W tabeli 16B, reszta cukrowa D powinna być anomerem β .
- Jak wyznaczono intensywność sygnałów B i C na widmie ¹H NMR? Wydaje się, że sygnały te się nakładają. Czy nie lepiej porównać tylko intensywności A i D? (s. 128).
- „Należy zauważyć, że oba preparaty egzopolisacharydów miały zbliżony skład jakościowy i ilościowy” (s.148). Biorąc pod uwagę wyniki zamieszczone w tabeli można stwierdzić iż skład jakościowy jest praktycznie taki sam, natomiast skład ilościowy jest wyraźnie inny – stosunek Man:Glc:Gal jest ~8:1:1 i ~6:3:2 (tab. 21). Podobne sformułowanie znalazło się w *Podsumowaniu* (s.159).
- *Wykaz skrótów* (s.184-185). Czym się różni CPS od KPS?; Wyjaśniono tylko nazwę eksperymentów NMR HMQC, NOESY i TOCSY, natomiast brakuje opisu jakie informacje strukturalne można z nich uzyskać.

- Kilka literówek, np.: „opisany został w przez” (s.88), „poprzez wobec wody” (s.91), „ter-butanolu” (s.96),
- Brakuje odnośników literaturowych lub wyjaśnień, np. do: „Dane uzyskane na podstawie ^{13}C NMR wskazują, że wszystkie podstawniki cukrowe występują w formie piranoz” (s.115),
- Kilka wyrażen żargonowych lub mało precyzyjnych: zamiast „w celu degradacji zmetylowanych polisacharydów” lepiej użyć „w celu rozszczepienia wiązań glikozydowych” (s. 93), powinno być „borowodorku sodu” (s. 93, s.95), „materiał kolumny eluowano” (s.94), „metoda chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas” (metoda sprzężona ze spektrometrem; s.94), zamiast „trimetylosililację” lepiej użyć „siliłowanie” (s.94), zamiast „produktów metylacji” lepiej użyć „produktów metylowania” (s.95), „preparaty inkubowano przez 30 minut” - termin „inkubacja” bardziej odnosi się do procesów biologicznych (s.95, s.96), zamiast „Sephadex CL-6B” powinno być „Sephacrose CL-6B” (s.97), „skład węglowodanowy” lepiej zastąpić „składem cukrowym” (s.104), „długotrwała metanoliza” (s.107), „pękanie wiązań” lepiej „rozszczepienie wiązań” (s.110), „węglanu amonu jako solwentu” (s.111), „węglu niosącego azot” (s.115), „w dół pola” (s.118), „frakcja wysokocząsteczkowa będzie reprezentowana najobficiej”(s.120), „wstępne podstawienie labilnych protonów deuterem” (s.123).
- Duża niekonsekwencja w używaniu spacji przy zapisie liczb i jednostek, np. „h” (s.92), „M” (s.93), „%” (s.97), „ml” (s.100).
- Używanie kropek do zapisywania ułamków dziesiętnych, np. pH (s. 89), tabela 9, 11-13.

Wszystkie powyższe uwagi mają przede wszystkim charakter dyskusyjny i nie pomniejszają bardzo dużej wartości poznawczej rozprawy.

W podsumowaniu chcę podkreślić, że praca jest wartościowa, została prawidłowo zaplanowana i zrealizowana. Wnosi oryginalny wkład do wiedzy o strukturze polisacharydów O-swoistych, egzopolisacharydów oraz peryplazmatycznych glukanów bakterii szczepów *Ochrobactrum cytisi* ESC1^T i *Ochrobactrum lupini* LUP21^T. Doktorantka wykazała się rozległą znajomością piśmiennictwa, które jest prawidłowo wykorzystane, sprawnie posługuje się technikami separacyjnymi i spektroskopowymi, jako narzędziami niezbędnymi do wyizolowania LPS-ów, egzopolisacharydów oraz peryplazmatycznych glukanów, otrzymania polisacharydów O-swoistych, a następnie określenia ich struktury chemicznej.

Reasumując, przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia ustawowe kryteria stawiane pracom doktorskim (Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku, z późniejszymi zmianami). W związku z tym wnioskuję do Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie mgr Małgorzaty Pac-Sosińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z. Kąkol