

Poznań, 23 czerwca 2019 r.

dr hab. inż. Krzysztof Pudełko
Katedra Biochemii i Biotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Dojazd 11, 60-632 Poznań

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Marka Wójcika

pt. „Zastosowanie ryzobiów do wspomagania wzrostu roślin bobowatych na glebach skażonych jonami metali ciężkich”, wykonanej w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii UMCS w Lublinie.

Recenzja została przygotowana na prośbę Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie przekazaną pisemnie w dniu 23 maja 2019 r. przez Dziekana Wydziału, Pana prof. dr hab. Kazimierza Trębacza.

Przygotowana przez Pana Magistra Marka Wójcika rozprawa doktorska dotyczy prób izolacji populacji mikroorganizmów glebowych naturalnie obecnych w glebach skażonych występującymi w nich metalami ciężkimi pochodzenia antropogenicznego i możliwości wykorzystania tych populacji w działaniach zmierzających do rekultywacji stanowisk zdegradowanych. Zainteresowanie Doktoranta koncentrowało się na populacjach mikroorganizmów glebowych zdolnych do tworzenia efektywnych oddziaływań symbiotycznych z roślinami bobowatymi rosnącymi na glebach o podwyższonej zawartości cynku, kadmu i ołowiu. Pan Magister Wójcik za cel postawił sobie wyszukanie układu symbiotycznego możliwego do późniejszego wykorzystania dla rekultywacji terenów skażonych tymi metalami ciężkimi. W pracy jako źródło potencjalnie efektywnych mikrobiologicznych partnerów symbiotycznych wykorzystano hałdę odpadów cynkowo-ołowiowych zlokalizowaną w Bolesławiu.

Postawiony cel badawczy Pan Magister Marek Wójcik, w trakcie badań będących podstawą ocenianej rozprawy doktorskiej, zrealizował.

Ocena formalna

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska liczy 109 stron, zawiera 40 tabel oraz 23 ilustracje obejmujące ryciny, fotografie i dendrogramy przygotowane na podstawie uzyskanych sekwencji nukleotydowych. Tytuł pracy jest dobrze sformułowany i właściwie odnosi się do jej treści. W rozprawie zacytowano 169 pozycji literaturowych, w tym 127 obcojęzycznych - 54 cytowane prace były opublikowane po 2010 roku. Oceniana rozprawa ma typowy dla tego typu opracowań układ na który składają rozdziały takie jak Wstęp, Materiały i metody, Cel pracy, Wyniki, Dyskusja, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wykaz cytowanej literatury oraz spis ilustracji i tabel. Wydaje się, że rozdział Cel pracy powinien znajdować się przed rozdziałem Materiały i Metody, ponieważ metody badawcze były zapewne dobrane na podstawie sformułowanego celu badań, a nie odwrotnie. Poza tą uwagę, praca od strony formalnej nie budzi zastrzeżeń i jest właściwie przygotowana.

Ocena merytoryczna

Podjęta przez Doktoranta tematyka badawcza jest aktualna, gospodarczo istotna i budząca znaczne zainteresowanie w Polsce i na świecie. Technologiczne wykorzystanie naturalnie występujących w przyrodzie populacji organizmów do oczyszczania bądź rekultywacji terenów zniszczonych w wyniku działalności człowieka stanowi jeden ze znaczących nurtów współczesnej agrobiotechnologii coraz szerzej dyskutowanych w literaturze i zyskujących wciąż większego znaczenia ekonomicznego i ekonomiczno-społecznego. Zanieczyszczenie metalami ciężkimi gleb w Polsce ma charakter lokalny i dotyczy szczególnie rejonów wysoko uprzemysłowionych lub punktowo występujących źródeł emitujących zanieczyszczenia takich jak fabryki, wielkie miasta czy miejsca katastrof przemysłowych. Rekultywacja terenów zdegradowanych, zanieczyszczonych metalami

ciężkimi jest działaniem technologicznie złożonym i często bardzo kosztownym. Jednym z najbardziej racjonalnych ekonomicznie kierunków zabezpieczania i późniejszej rekultywacji tak zdegradowanych obszarów jest agrobiotechnologiczne wykorzystanie naturalnie występującej, również w ekosystemach zaburzonych przez występujące w nich zanieczyszczenia, zmienności i plastyczności populacji mikroorganizmów glebowych. Organizmy takie mogą być wykorzystane bezpośrednio do oczyszczania gleb zdegradowanych lub do wspomagania wzrostu roślin kolonizujących wyrobiska lub hałdy pogórnice. Doktorant uwagę swoją skierował na ten właśnie model wykorzystania mikroorganizmów i za cel postawił sobie wyselekcjonowanie układów symbiotycznych, składających się z roślin bobowatych i właściwych im szczepów mikrosymbiontów, zdolnych do rozwoju na glebach zanieczyszczonych metalami ciężkimi, które wykazują potencjał do wykorzystania ich w procesach rekultywacji gleb skażonych jonami kadmu, cynku i ołowiu. Praca oparta jest na wynikach doświadczeń laboratoryjnych i wazonowych doświadczeń szklarniowych z wykorzystaniem szczepów bakterii izolowanych z brodawek korzeniowych pięciu gatunków *Fabaceae* rosnących na terenie składowiska odpadów cynkowo-ołowiowych w Bolesławiu. Gatunki te to koniczyna biała, koniczyna łąkowa, koniczyna drobnogłówkowa, komonica zwyczajna i przelot zwyczajny. Doktorant podjął się charakterystyki molekularnej, fizjologicznej i odporności na metale ciężkie uzyskanych szczepów bakterii, a następnie analizował przydatność wyselekcjonowanych szczepów do wspomagania wzrostu sześciu gatunków bobowatych rosnących na glebach zanieczyszczonych. W wyniku przeprowadzonych analiz Doktorant zaproponował parę koniczyna łąkowa – wyselekcjonowany szczep *Rhizobium leguminosarum* TR4 jako potencjalnie najbardziej efektywny układ do wykorzystania w celu rekultywacji terenów zanieczyszczonych metalami ciężkimi. Wyselekcjonowany w rezultacie przeprowadzonych prac szczep *R. leguminosarum* TR4 i jego zastosowanie stały się przedmiotem zgłoszenia patentowego w Urzędzie Patentowym RP.

Tytuł ocenianej rozprawy został właściwie sformułowany i dobrze reprezentuje prezentowaną w niej treść.

Rozdział *Wstęp* stanowi konieczne wprowadzenie do zagadnień rozważanych w dalszej części rozprawy. W tym fragmencie pracy Autor zasygnalizował zagadnienia związane z układami symbiotycznymi bobowate-ryzobia, oraz problematyką występowania metali ciężkich w ekosystemach, ich źródłach, wpływie na organizmy żywe (zwłaszcza rośliny i mikroorganizmy) oraz z wykorzystaniem roślin bobowatych w symbiozie z *Rhizobiaceae* w rekultywacji terenów zanieczyszczonych. Ta część pracy obejmuje 18 stron, ma właściwą konstrukcję i opiera się na dobrze dobranych źródłach literaturowych, nie stanowi jednak opracowania, które mogłoby zostać opublikowane oddzielnie - ale zapewne nie takie było zamierzenie Autora.

W tym miejscu sugerowałbym jednak przeformułowanie zdania znajdującego się na początku tego rozdziału (s. 5): „Z uwagi na zdolność do symbiotycznego wiązania azotu rośliny bobowate są także bardzo istotnymi elementami ekosystemów naturalnych [...]” - Autor w dalszej części rozdziału oczywiście szczegółowo omawia fakt, że to bakteryjny partner symbiozy odpowiedzialny jest za wiązanie azotu, ale przytoczone zdanie może być w tym kontekście mylące. Wydaje się także, że podrozdział dotyczący agrotechnicznego zastosowania czynników Nod zasługiwałby na nieco więcej miejsca – zwłaszcza, że w części eksperymentalnej pracy Autor poświęcił tej problematyce sporo uwagi.

Niezależnie od powyższych sugestii uważam, że jako wprowadzenie do problematyki pracy zawartość rozdziału *Wstęp* jest wystarczająca.

Jak wcześniej wspomniano, wydaje się, że po *Wstępie* w rozprawie powinien znaleźć się rozdział *Cel pracy*. Niezależnie od jego lokalizacji w tekście, rozdział ten w sposób właściwy przedstawia problem badawczy, którego realizacji Autor poświęcił część eksperymentalną. Sugeruję jednak zmianę sformułowania (pkt. 2) „roślin hodowanych w

warunkach imitujących warunki panujące na terenach zdegradowanych” na „roślin uprawianych” - bo to przecież uprawy, a nie hodowli bobowatych dotyczy oceniana rozprawa.

W rozdziale *Materiały i metody* Autor szczegółowo przedstawia szeroki zakres metod wykorzystanych w ocenianej pracy. Zastosowane metody zostały właściwie dobrane do celu badań i obejmowały techniki z zakresu klasycznej mikrobiologii środowiskowej, fizjologii mikroorganizmów, techniki biologii molekularnej, a także uprawy roślin w warunkach *in vitro*.

Przed przygotowaniem pracy do publikacji sugeruję rozważyć pewne poprawki i uściślenia, takie jak:

- zamieszczenie krótkiej charakterystyki hałdy w Bolesławiu uzasadniającej fakt, że właśnie tę lokalizację Autor wybrał jako źródło materiału biologicznego do dalszych badań – wprawdzie Autor umieszcza te informacje w rozdziale *Dyskusja*, ale uzasadnienie wyboru lokalizacji będącej źródłem analizowanych szczepów stanowi też element przyjętej metodologii badawczej
- s. 32 i dalsze: „rośliny uprawiano” zamiast „rośliny hodowano”
- podając składniki mieszaniny do reakcji PCR warto umieścić informację o stężeniu starterów i matrycy DNA, a nie tylko objętości tych składników w reakcji
- podając informację o warunkach elektroforezy należałoby raczej zamieścić informację o napięciu na cm żelu, a nie całkowite stosowane napięcie
- sformułowanie „nocne hodowle badanych szczepów” wydaje się sformułowaniem żargonowym
- s. 40 (17. Badanie aktywności biologicznej preparatu czynników Nod): Autor podaje, że „nasiona [...] namaczano w wodnych roztworach preparatów czynników Nod o różnych stężeniach (10^{-2} – 10^{-6})”, a powinno być raczej „o różnych rozcieńczeniach”, ponieważ

preparat wyjściowy czynników Nod stanowił ekstrakt, w którym stężenia czynników Nod nie określano, a jedynie ten ekstrakt był rozcieńczany.

- wydaje się, że opis stosowanych metod statystycznych zasługuje na nieco więcej miejsca, niż tylko dwie linie tekstu.

Rozdział *Wyniki* składa się z 12 punktów przedstawiających w sposób logiczny rezultaty zasadnie przyjętego schematu badawczego prowadzącego od izolacji stosunkowo szerokiej populacji mikrosymbiontów kilku gatunków bobowatych, wstępnej ocenie ich zróżnicowania genetycznego, poprzez ocenę wrażliwości wybranych szczepów na metale ciężkie i ich zdolności do brodawkowania wybranych gatunków *Fabaceae*. W kolejnych krokach Autor podjął próbę ustalenia pozycji taksonomicznej wyselekcjonowanych szczepów, oceny ich zróżnicowania metabolicznego oraz wyboru szczepów najbardziej odpornych na obecność metali ciężkich w pożywce i nadal zdolnych do brodawkowania roślin bobowatych. Końcowe etapy pracy obejmowały ocenę wpływu wybranego szczepu bakterii na wzrost koniczyny łąkowej i tworzenie brodawek na korzeniach rośliny w obecności metali ciężkich. Przyjęty schemat eksperymentalny uważam za prawidłowo zaplanowany i właściwie zrealizowany. Jego przeprowadzenie doprowadziło do wyboru szczepu *R. leguminosarum* TR4 brodawkującego koniczynę łąkową w warunkach podwyższonego zanieczyszczenia metalami ciężkimi a następnie jego zgłoszenie wraz z potencjalnym zastosowaniem w Urzędzie Patentowym RP. Jest to niewątpliwe osiągnięcie ocenianej rozprawy.

W tym miejscu prosiłbym o wyjaśnienie pewnych wątpliwości:

1. Czy odrzucenie dużej grupy 24 z 62 pierwotnie uzyskanych szczepów z powodu trudności w amplifikacji fragmentu genu *nodA* i wnioskowanie na tym etapie o ich niezdolności do nawiązywania efektywnej symbiozy, mimo że szczepy te były izolowane z brodawek korzeniowych, nie było decyzją pochopną i nadmiernie

ograniczającą wyjściowe zróżnicowanie badanej populacji już na wczesnym etapie prac?

2. Jak wyjaśnić dużą liczbę brodawek na roślinach grupy kontrolnej (Tab. 20-22 Grupa N) opisanej jako „koniczyna łąkowa rosnąca bez dodatku bakterii symbiotycznych”. Czy stosowane w tym doświadczeniu podłoże i nasiona były sterylizowane?
3. Jak wyjaśnić dużą liczbę brodawek na korzeniach roślin nieinokulowanych (Tab. 23-26, Grupa K) rosnących w kontrolowanych warunkach szklarniowych. Czy analizowano jakie szczepy zasiedlają te brodawki korzeniowe i czy porównywano zasiedlenie brodawek Grupy K z tymi z grup TR4 i TR4+Nod?
4. W podsumowaniu punktu 10. rozdziału *Wyniki* Autor pisze: „Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że szczep *R. leguminosarum* TR4 jest zdolny do nawiązania efektywnej symbiozy z koniczyną łąkową w obecności jonów metali ciężkich w podłożu [...]” - w jaki sposób Autor uzasadnia takie wnioskowanie wobec wykazanej w punkcie 11. efektywności czynników Nod, które stymulowały powstawanie większej liczby brodawek także na korzeniach roślin uprawianych bez inokulacji szczepem TR4?
5. Dlaczego w punktach 11-12 rozdziału *Wyniki* Autor zrezygnował ze stosowania analizy *post hoc* podczas gdy wykorzystywał test Tukey’a we wcześniejszych częściach pracy? Wydaje się, że w tym miejscu porównanie grup TR4, Nod i TR4+Nod byłoby szczególnie interesujące.

Rozdział *Dyskusja* w sposób prawidłowy, spójny i kompletny podsumowuje uzyskane przez Autora wyniki i stanowi mocną część ocenianej rozprawy. Rozdziały *Streszczenie* i przygotowany w języku angielskim *Summary* zawierają krótkie informacje metodyczne, cel pracy oraz podane w formie skondensowanej uzyskane wyniki.

Ocena końcowa

Recenzowaną rozprawę kwalifikuję jako rozprawę doktorską za następujące osiągnięcia:

- podjęcie tematyki badawczej trafnej zarówno pod względem poznawczym, jak i utylitarnym
- wykorzystanie zróżnicowanej i pracochłonnej metodyki badawczej obejmującej techniki molekularne, chemiczne, mikrobiologiczne i agronomiczne
- właściwą analizę zgromadzonego materiału badawczego oraz prawidłowe sformułowanie wniosków.

Za najbardziej wartościowe osiągnięcie ocenianej rozprawy uważam wyizolowanie i scharakteryzowanie szczepów *Rhizobiaceae* rosnących w warunkach podwyższonego zanieczyszczenia gleby metalami ciężkimi przy zachowaniu ich zdolności do brodawkowania roślin bobowatych. Utylitarny charakter rozprawy podkreśla zgłoszenie patentowe wyselekcjonowanego szczepu TR4 oraz jego zastosowania do Urzędu Patentowego, co wraz z wykorzystanymi metodami badawczymi lokuje ocenianą pracę w obrębie dyscypliny biotechnologia.

Uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawiera istotne naukowe i utylitarne elementy. Stanowi oryginalne opracowanie naukowe. Stwierdzam, że rozprawa „Zastosowanie ryzobiów do wspomagania wzrostu roślin bobowatych na glebach skażonych jonami metali ciężkich” spełnia wymagania sformułowane w Ustawie z 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i na tej podstawie wnioskuję o dopuszczenie mgr Marka Wójcika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. inż. Krzysztof Pudełko

