



dr hab. inż. Karol Fijałkowski, prof. ZUT

Szczecin, dn. 22/06/2020

Recenzja rozprawy doktorskiej  
Pani mgr Magdaleny Kopycińskiej  
pt. „Rola egzopolisacharydu w adaptacji bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*  
do warunków stresowych wywołanych obecnością jonów cynku”  
wykonanej w Katedrze Genetyki i Mikrobiologii,  
Wydziału Biologii i Biotechnologii,  
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej  
w Lublinie  
pod opieką naukową prof. dr hab. Moniki Janczarek (promotor)  
oraz dr hab. Jolanty Cieśli (promotor pomocniczy)

## 1. Dobór problematyki badawczej i tematu rozprawy

Badania eksperymentalne wchodzące w skład recenzowanej pracy były wykonane przez Panią mgr Magdalenę Kopycińską w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (konkurs OPUS), kierowanego przez promotora Doktorantki Panią prof. dr hab. Monikę Janczarek, zatytułowanego "Mechanizmy adaptacyjne *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* do warunków stresu środowiskowego i w symbiozie z koniczyną".

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest ciekawą i nowatorską pracą przedstawiającą, w sposób kompleksowy i szczegółowy zagadnienia związane z wpływem jonów cynku na właściwości fenotypowe oraz symbiotyczne szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* różniących się pod względem ilości wytwarzanego egzopolisacharydu (EPS). Ponadto, Autorka podjęła się trudu określenia wydajności biosorpcji jonów cynku przez EPS wyizolowany z hodowli jednego z analizowanych szczepów.

Współczesna nauka coraz więcej uwagi poświęca monitorowaniu stanu środowiska, w szczególności na obszarach silnie uprzemysłowionych. Intensywny rozwój przemysłu spowodował, iż środowisko glebowe i wodne terenów zindustrializowanych coraz częściej charakteryzuje się znaczną zawartością metali ciężkich. W ostatnich latach szczególnie dużo uwagi poświęca się między innymi możliwości usuwania substancji szkodliwych, w tym metali ciężkich ze środowisk zanieczyszczonych na skutek działalności antropogenicznej z wykorzystaniem do tego celu metod biotechnologicznych opartych o wykorzystanie drobnoustrojów charakteryzujących się odpowiednim potencjałem remediacyjnym. Zastosowanie biotechnologicznych metod remediacji stanowi istotną alternatywę dla konwencjonalnie stosowanych fizykochemicznych metod oczyszczania środowiska.

Do drobnoustrojów o wysokim potencjale bioremediacyjnym można zaliczyć bakterie z rodzaju *Rhizobium*, które charakteryzują się zdolnością do nawiązywania symbiozy z roślinami motylkowatymi, a także syntezą dużych ilości EPS. W naturze, polimer ten stanowi barierę ochronną bakterii przed niekorzystnymi warunkami panującymi w glebie. Struktura chemiczna tej substancji umożliwia

niespecyficzne wiązanie metali ciężkich, w tym np. cynku. Dlatego możliwość wykorzystania drobnoustrojów zdolnych do wytwarzania dużych ilości EPS charakteryzuje duży potencjał aplikacyjny w oczyszczaniu gleb i wód skażonych metalami ciężkimi przy minimalnej ingerencji w środowisko. Dotychczas nie przeprowadzono jednak kompleksowych badań dotyczących wpływu jonów cynku, na właściwości fenotypowe oraz zdolności symbiotyczne ryzobiów w powiązaniu z ilością wytwarzanego przez nie egzopolisacharydu. Uzasadnia to tym samym konieczność prowadzenia dalszych badań, w celu poszerzenia wiedzy związanej rolą EPS w adaptacji bakterii do warunków stresowych wywołanych obecnością jonów metali ciężkich oraz z czynnikami wpływającymi na mechanizmy jego biosyntezy, co następnie może zostać wykorzystane w wielu procesach biotechnologicznych, a w szczególności w bioremediacji.

Dlatego, z całą pewnością wybór tematu recenzowanej rozprawy należy uznać za bardzo trafny i dotyczący aktualnego, niedostatecznie zbadanego zagadnienia, a ponadto w znacznym stopniu wychodzącego naprzeciw oczekiwaniom praktyki. Zagadnienia jakich dotyczy recenzowana rozprawa doktorska są ciekawe i wpisują się w tematykę nurtu badań związanych z wykorzystaniem drobnoustrojów w biotechnologicznych procesach oczyszczania środowiska.

## 2. Ocena formalno-redakcyjna pracy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska liczy 182 strony. Dysertacja posiada bogatą stronę graficzną, zawiera 12 tabel oraz 42 ryciny. Składa się z 9 zasadniczych rozdziałów, typowych dla prac o charakterze eksperymentalnym, a ponadto z 3 rozdziałów o charakterze pomocniczym. Rozprawę doktorską rozpoczyna spis treści oraz wykaz skrótów. W dalszej kolejności Autorka zamieściła streszczenie w języku polskim i angielskim, w każdym przypadku kończąc je spisem słów kluczowych. Zasadnicza część dysertacji podzielona została na rozdziały: Wstęp, Hipoteza i Cel Pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i Wnioski oraz Bibliografię. W końcowej części pracy Autorka zawarła Wykaz Tabel i Rycin oraz Życiorys Naukowy, w którym poza osiągnięciami naukowymi prezentuje również swoje dokonania w ramach pracy na rzecz Wydziału jak i Uczelni.

Oceniając pracę pod względem redakcyjnym uważam, że zasadniczo jest ona napisana jasnym, zrozumiałym i w większości poprawnym językiem. Stronę graficzną dysertacji oceniam również jako poprawną. Dane zawarte w tabelach, na wykresach i schematach są czytelne i informatywne. Sekwencja rozdziałów jest logiczna, tworzą one zwartą harmonijną całość. W pracy zachowane zostały odpowiednie proporcje między poszczególnymi rozdziałami. Struktura wewnętrzna rozdziałów jest dobrze uzasadniona i podporządkowana celom badawczym.

Zwracam jedynie uwagę, że w przypadku dalszego wykorzystania wyników opisanych w niniejszej pracy, np. podczas przygotowywania publikacji naukowych warto wziąć pod uwagę możliwość ujednolicenia stosowanej terminologii i jednostek, co z pewnością zwiększy czytelność omawianych zagadnień. Jako przykład, zarówno w opisach jak i w tytułach rozdziałów Autorka stosuje kilka różnych zapisów dotyczących wykorzystywanego w pracy metalu ciężkiego: „cynk”, „jony cynku”, „Zn<sup>2+</sup>” oraz „ZnSO<sub>4</sub>” i „ZnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O”. Czas trwania hodowli lub inkubacji określany jest w dniach lub godzinach, np. 72 godziny lub 3 dni, stężenie NaOH wyrażane jest najczęściej w molach, ale również jako stężenie normalne (dwie ostatnie uwagi dotyczą tylko pojedynczych przypadków).

Drobna uwaga redakcyjna dotyczy również nazwy rozdziału 6.3. oraz jego podrozdziału 6.3.3., które są takie same oraz kolejności podrozdziałów w rozdziale Wyniki, które nie odpowiadają kolejności podrozdziałów w rozdziale Materiały i Metody.

Rozdział Wyniki zawiera pewną ilość opisów bardziej charakterystycznych dla rozdziału Dyskusja. Na przykład, na stronie 84 Autorka dokonuje interpretacji znaczenia wyników uzyskiwanych w wyniku pomiaru OD oraz CFU. Na tej samej stronie, na początku rozdziału 6.1.2. „Wpływ jonów  $Zn^{2+}$  na poziom syntezy EPS przez *R. leguminosarum* bv. *trifolii*”, Autorka odnosi się do danych literaturowych, w tym również do prac zespołu, w którym pracowała. Z kolei na stronie 105, Doktorantka dokonuje podsumowania uzyskanych wyników i przedstawia je w formie wniosku.

Na Rycinie 25, przedstawiającej biofilm zwizualizowany za pomocą mikroskopu konfokalnego, Autorka korzystnie mogłaby zaznaczyć opisywane charakterystyczne cechy jego struktury, jak np. kanały wodne. Jest to szczególnie istotne w związku z obniżoną jakością zdjęć w wyniku wydruku, która powoduje, że elementy te są w zasadzie niezauważalne.

### 3. Ocena merytoryczna pracy

Praca doktorska Pani mgr Magdaleny Kopycińskiej to dobrze zaplanowany i wykonany eksperyment naukowy z wykorzystaniem bardzo szerokiego wachlarza metod mikrobiologicznych, chemicznych i biofizycznych, jak również zaawansowanych technik obrazowania z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej. Ponadto, Autorka przeprowadziła również liczne doświadczenia na materiale roślinnym.

W ramach wykonywanej pracy, Doktorantka podjęła się próby ustalenia roli EPS w adaptacji bakterii *R. leguminosarum* bv. *trifolii* do stresu środowiskowego wywołanego obecnością jonów cynku. Autorka ustaliła między innymi jaki jest wpływ jonów cynku na przeżywalność, kinetykę wzrostu, ilość oraz strukturę tworzonego biofilmu przez analizowane szczepy drobnoustrojów. Ponadto Doktorantka określiła jak obecność jonów cynku wpływa na poziom syntezy EPS oraz innych polisacharydów powierzchniowych, agregację komórek analizowanych drobnoustrojów, ich ruchliwość oraz wydajność oddychania komórkowego. Przeanalizowała również zmiany we właściwościach powierzchniowych, charakterze kwasowo-zasadowym, ruchliwości elektroforetycznej oraz hydrofobowości, zwilżalności, a także powierzchniowej energii swobodnej komórek ryzobiów inkubowanych z jonami cynku. W kolejnym etapie pracy, Autorka przeanalizowała wpływ jonów cynku na właściwości symbiotyczne analizowanych szczepów bakterii z koniczyną łąkową jako gospodarzem roślinnym, analizując przy tym adhezję oraz efektywność infekcji korzenia koniczyny, a także kinetykę brodawkowania. Do osiągnięcia powyższych celów Doktorantka wykorzystwała 5 szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* różniących się poziomem syntezy EPS. W ostatnim etapie, Autorka podjęła się trudu oceny potencjału bioremediacyjnego wyzisolowanego EPS.

Z całą pewnością wyniki jakie uzyskała i zaprezentowała Doktorantka poszerzyły wiedzę na temat roli EPS w adaptacji *R. leguminosarum* bv. *trifolii* do stresu środowiskowego wywołanego obecnością jonów cynku. Doktorantce udało się ustalić, że jony cynku hamują wzrost komórek analizowanych szczepów ryzobiów, ale nie wpływają istotnie na ich przeżywalność. Przy czym, jak ustaliła Autorka toksyczny wpływ jonów cynku zależy nie tylko od ich stężenia ale również od ilości produkowanego EPS. Dodatkowo, Autorka dowiodła, że jony cynku, jako wynik reakcji obronnej, stymulują proces syntezy EPS oraz innych polisacharydów powierzchniowych, a także zwiększają ilość tworzonego biofilmu. Doktorantka dowiodła również, że szczepy nadprodukujące EPS charakteryzują się znacznie lepszą efektywnością symbiozy z koniczyną w warunkach stresu wywołanego obecnością metalu ciężkiego. Ważnym osiągnięciem przeprowadzonych prac badawczych było ponadto udowodnienie potencjału aplikacyjnego EPS, wynikającego z wysokiej wydajności wiązania jonów cynku przez ten biopolimer.

## Wstęp

We Wstępie (str. 15-57), liczącym 43 strony w kompletny sposób przedstawiono zagadnienia bezpośrednio związane z problematyką pracy doktorskiej. Autorka opisała kolejno metale ciężkie w kontekście zagrożenia dla środowiska, toksyczności oraz funkcji w komórkach organizmów, a następnie bardziej szczegółowo scharakteryzowała cynk i jego rolę w przyrodzie oraz znaczenie biologiczne dla mikroorganizmów i roślin. W kolejnych rozdziałach tej części pracy, Doktorantka dokonała charakterystyki bakterii z rodzaju *Rhizobium* oraz wytwarzanych przez nie polisacharydów powierzchniowych. Kolejny rozdział poświęcony został czynnikom abiotycznego stresu środowiskowego i mechanizmom adaptacyjnym ryzobiów. W ostatnim rozdziale Wstępu scharakteryzowany został potencjał aplikacyjny zarówno ryzobiów, jak i wytwarzanego przez nie EPS w ochronie środowiska i bioremediacji.

Podsumowując, w mojej opinii wszystkie rozdziały części teoretycznej stanowią dużą wartość naukową oraz świadczą o wiedzy i dobrym przygotowaniu Autorki do podjętego problemu badawczego. Rozdział ten podaje jasno i wyczerpująco informacje niezbędne dla zrozumienia i docenienia wyników prezentowanych w dalszej części pracy. Ta część pracy doktorskiej została przygotowana przez Autorkę dysertacji z dużą starannością i odpowiednio dobranym, aktualnym piśmiennictwem, w pełni odzwierciedlającym stan wiedzy Doktorantki z zakresu podjętego tematu. W rozdziale tym na szczególne docenienie zasługuje dokładna charakterystyka polisacharydów powierzchniowych produkowanych przez ryzobia, zamieszczona w rozdziale 3.5. Na podkreślenie i uznanie zasługuje również starannie wykonana oprawa graficzna.

Do tej części pracy chciałbym zadać pytanie, o hipotezę jaką sformułowałaby Doktorantka dla wykonanych badań w świetle dostępnych danych literaturowych przedstawionych w omawianym rozdziale. Pytanie to ma również związek z kolejnym rozdziałem, tj. Hipoteza i Cel, w którym Autorka przedstawia podstawowy cel swoich badań, jak również cele szczegółowe, poprzedzone krótkim wstępem teoretycznym i zdaniem, które według mnie jest powtórzeniem tematu pracy, natomiast w rozdziale tym nie odnajduję sformułowania, które można byłoby uznać za hipotezę.

## Hipoteza i Cel

Przedstawione przez Doktorantkę cele pracy (str. 58) są ambitne i w mojej opinii, w większości sformułowane zostały w prawidłowy sposób i uporządkowane w logiczny ciąg. Niemniej jednak, po dokładnej lekturze pracy, a przede wszystkim biorąc pod uwagę liczbę i szczegółowość wyciągniętych wniosków uważam, że Autorka mogła spróbować sformułować więcej celów szczegółowych. Na przykład, w kontekście właściwości fenotypowych analizowanych szczepów, można byłoby sformułować cele dotyczące wpływu jonów cynku na żywotność, kinetykę wzrostu, ilość i strukturę wytwarzanego biofilmu, poziom syntezy EPS oraz innych polisacharydów, a także aktywność enzymów wewnątrzkomórkowych. Z drugiej strony, w obecnym kształcie sformułowanych celów, szczegółowy cel nr 2, dotyczący właściwości powierzchniowych komórek bakteryjnych, czyli właściwości mieszczących się w zakresie fenotypu, można byłoby włączyć do celu pierwszego.

## Materiały i Metody

Rozdział ten (str. 25-38) obejmuje opis stosowanych w pracy szczepów bakterii *R. leguminosarum* bv. *trifolii* z uwzględnieniem ich zdolności do wytwarzania EPS, szczegółowy opis odczynników wykorzystywanych do poszczególnych analiz, a także podłoży do hodowli bakterii oraz roślin, a w dalszej części pracy odpowiednio szczegółowy opis przeprowadzanych analiz badawczych.

Uważam, że rozdział Materiał i Metody jest napisany w prawidłowy sposób, który przede wszystkim pozwala na odtworzenie doświadczeń na podstawie przedstawionych opisów. Zastosowane metody zostały właściwie dobrane do realizacji założonych celów badawczych. Należy tu podkreślić szeroki zakres metod

stosowanych w pracy przez Doktorantkę, co z całą pewnością wymagało bardzo dużego zaangażowania i nakładu pracy, a przede wszystkim dzięki czemu przedstawione w kolejnym rozdziale wyniki są przekonujące. Metodyczne zróżnicowanie wykonanych badań naukowych oraz ich prawidłowe dostosowanie do postawionego celu badawczego świadczy o profesjonalnym i wszechstronnym przygotowaniu Autorki do samodzielnego wykonywania części doświadczalnej pracy.

Na szczególne docenienie zasługuje wykonanie badań związanych z określeniem wpływu jonów cynku na kinetykę wzrostu analizowanych bakterii z wykorzystaniem, nie tylko testów pośrednich, jak np. pomiar gęstości optycznej, ale również poprzez wykonanie posiewów powierzchniowych w celu ustalenia jednostek tworzących kolonie (CFU) w przeliczeniu na 1 ml hodowli. Biorąc po uwagę liczbę analizowanych wariantów, zdecydowanie się na tak precyzyjną ale przy tym niezwykle pracochłonną metodę analiz, świadczy o wyjątkowej determinacji Doktorantki w skrupulatnym dążeniu do wypełnienia postawionych sobie celów badawczych w trakcie wykonywanej pracy doktorskiej.

#### Uwagi do rozdziału Materiały i Metody:

Chociaż Autorka utworzyła osobny rozdział, w którym bardzo dokładnie przedstawia wszystkie odczynniki wykorzystane do poszczególnych testów i analiz, to nie zauważyłem żeby wymieniony został związek stanowiący źródło jonów cynku.

Ustalenie liczby drobnoustrojów wyrażonej w jednostkach tworzących kolonie - jtk (ang. cfu - colony forming units) poprzez posiew na podłoże stałe, zakładając, że liczba powstających kolonii odpowiada liczbie żywych komórek w badanej próbce, nie jest równoznaczne z określeniem, jak to podaje Autorka miana bakterii w hodowli (miano bakterii to najmniejsza objętość badanego materiału, w którym znajduje się przynajmniej jedna żywa komórka mikroorganizmu wskaźnikowego).

Badanie struktury biofilmów z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej oraz barwników Syto-9 i jodek propidyny jest mocno organiczne ponieważ nie umożliwia zaobserwowania tzw. macierzy biofilmu, a jedynie komórki. Nie mniej jednak, zgodnie z informacjami podanymi przez Doktorantkę w opisie uzyskanych rezultatów, wykorzystując mikroskop konfokalny możliwe jest oszacowanie pokrycia powierzchni dna dołka oraz grubości biofilmu, a także stosunku liczby żywych do martwych komórek bakterii.

W kilku miejscach opisu metod Autorka podaje, że wykorzystane stężenie jonów cynku wynosiło 0 mM. W mojej opinii, w takim wypadku lepiej jest podać informację o braku obecności jonów cynku w analizowanej próbce.

W podrozdziale 5.2.1. „Hodowla szczepów *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*”, omówiona została również analiza wpływu jonów cynku na kinetykę wzrostu badanych szczepów bakterii, która mogłaby zostać wyodrębniona do osobnego podrozdziału.

Ostatni podrozdział rozdziału 5.2.14. „Badanie właściwości fizykochemicznych komórek szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*”, dotyczący analiz z wykorzystaniem wyizolowanego EPS powinien stanowić osobną część pracy, gdyż nie dotyczy on właściwości fizykochemicznych komórek.

Podrozdział 5.2.17.4., dotyczący analiz właściwości symbiotycznych Autorka zatytułowała „Testy próbówkowe”, co nie wiąże się z zakresem wykonywanych analiz.

#### Pytania do rozdziału Materiały i Metody:

Dlaczego w poszczególnych analizach wykorzystywano różny zakres stężeń lub różne stężenia  $ZnSO_4$ ? Na przykład, w oznaczaniu kinetyki wzrostu bakterii zakres stosowanych stężeń wynosił od 0,05 do 5 mM (w sumie stosowano 5 różnych stężeń), w określaniu przeżywalności, zakres stężeń wynosił od 0,01 do 10 mM (stosowano 7 różnych stężeń), podczas oznaczania ilości tworzonego biofilmu zakres stosowanych stężeń wynosił od 0,1 do 1 mM (stosowano 3 różne stężenia), do określenia struktury

biofilmów wykorzystano tylko stężenie wynoszące 1 mM, a w przypadku oznaczania hydrofobowości komórek ryzobiów zakres stężeń wynosił od 0,1 do 50 mM, zastosowano aż 16 różnych stężeń.

Czy metody opisane w rozdziale 5.2.5. „Izolacja polisacharydów ryzobiowych” zostały zweryfikowane co do rodzaju faktycznie izolowanego polisacharydu? Chociaż Autorka podaje cytowania Autorów, którzy opracowali założenia metodyczne dla poszczególnych procedur, to jednak stopień podobieństwa pomiędzy niektórymi z nich wydaje się bardzo duży, np. w przypadku izolacji polisacharydu kapsularnego (CPS) oraz cyklicznych  $\beta$ -glikanów jedynymi różnicami są ilość i stężenie końcowe dodawanego NaOH (40 ml 1N NaOH i 20 ml 1N NaOH + 20 ml H<sub>2</sub>O). Ponadto, w jaki sposób potwierdzana była czystość wyizolowanych polisacharydów (w szczególności brak komórek bakterii)?

## Wyniki

Uzyskane rezultaty badań opisane w rozdziale Wyniki (str. 39-67) przedstawione zostały w sposób staranny, klarowny i uporządkowany. Pomimo dużej liczby wyników uzyskanych przez Autorkę zostały one opisane w dokładny sposób, ponadto konsekwentnie i logicznie układają się w ciąg ilustrujący dążenie Autorki do rozwikłania postawionego problemu. Poza opisem, wyniki doświadczeń zostały również zaprezentowane zarówno w formie numerycznej, w czytelnych tabelach jak i obrazowej, na przejrzystych rycinach.

Rozdział ten Doktorantka rozpoczyna od ogólnej charakterystyki wpływu jonów cynku na parametry związane z kinetyką wzrostu, przeżywalnością oraz ilością i strukturą wytwarzanego biofilmu. Następnie przedstawione zostały wyniki związane z wpływem jonów cynku na ilość syntezowanego EPS, jak również pozostałych polisacharydów. W kolejnych podrozdziałach przedstawione zostały wyniki badań związanych z wpływem jonów cynku na agregację, ruchliwość oraz zużycie tlenu przez bakterie poddane czynnikowi stresowemu. W dalszej części opisu Wyników, przedstawione zostały zmiany w aktywności enzymów biorących udział w mechanizmach antyoksydacyjnych oraz właściwościach powierzchniowych komórek analizowanych szczepów bakterii inkubowanych w obecności różnych stężeń jonów cynku. W ostatnich rozdziałach Doktorantka dokonała szczegółowej analizy wpływu jonów cynku na efektywność infekcji korzenia i symbiozy z koniczyną łąkową, w tym w obecności jonów cynku oraz charakterystyki procesu sorpcji jonów cynku przez EPS wyizolowany z hodowli dzikiego szczepu *R. leguminosarum* bv. *trifolii*.

W rozdziale Wyniki, na szczególne docenienie zasługuje oprawa graficzna, na którą składają się m.in. liczne zdjęcia wykonane w trakcie przeprowadzanych eksperymentów, jak również czytelne wykresy, na których prezentowane są wyniki uzyskiwane w kolejnych eksperymentach. W sumie, wyniki badań zostały zobrazowane na 24 czytelnych rycinach, w tym 6, na których prezentowane są zdjęcia oraz w 4 tabelach.

W mojej opinii jest to bardzo dobrze napisany rozdział, a szerokie wykorzystanie metod badawczych w charakterystyce badanych szczepów, pozwoliło Autorce na zebranie ważnych informacji w aspekcie znaczenia EPS w adaptacji bakterii *R. leguminosarum* bv. *trifolii* do warunków stresowych wywołanych obecnością jonów cynku. Uzyskane wyniki mają nowatorski charakter, są znaczące poznawczo oraz wnoszą istotne elementy o znaczeniu nie tylko naukowym, ale również praktycznym.

Do tej części pracy chciałbym zadać pytanie dotyczące analizy wpływu jonów cynku na ruchliwość analizowanych szczepów ryzobiów. Brak widocznej kolonii bakteryjnej przy stężeniu jonów cynku wynoszącym 0,1 mM Autorka interpretuje jako zahamowanie ruchliwości bakterii. Zastanawia mnie jednak, na ile ten wynik może mieć również związek z zahamowaniem wzrostu drobnoustrojów?

## Dyskusja

Kolejnym rozdziałem recenzowanej rozprawy doktorskiej jest Dyskusja (str. 125-140). Rozdział ten liczy 16 stron. Doktorantka w sprawny sposób omówiła w nim swoje wyniki w konfrontacji z dostępnymi danymi innych zespołów. Jest to dobrze napisany rozdział z odniesieniami do aktualnej i adekwatnej literatury cytowanej w bibliografii. W mojej opinii, zarówno rozdział Wyniki jak i Dyskusja, świadczą o opanowaniu nowoczesnego warsztatu badawczego i dojrzałego podejścia Doktorantki do osiągnięć swojej pracy.

## Podsumowanie i Wnioski

Rozprawę kończy rozdział Podsumowanie i Wnioski (str. 82), w którym Doktorantka przedstawiła najważniejsze osiągnięcia swojej pracy oraz konkluzje płynące z przeprowadzonych badań. Sformułowane Wnioski są poprawne i oparte na uzyskanych wynikach, chociaż w mojej opinii niektóre z nich mają bardziej charakter dość szczegółowego podsumowania uzyskanych wyników, niż typowych wniosków o nieco większym stopniu uogólnienia.

## Bibliografia

Do zredagowania pracy Autorka wykorzystała 342 pozycje literaturowe, w większości napisane w języku angielskim i opublikowane w renomowanych czasopismach, które ukazały się w ostatnich latach. Wykaz cytowań zawiera również publikacje pracowników Katedry Genetyki i Mikrobiologii UMCS oraz pracę, w której Doktorantka jest pierwszym autorem i która dotyczy tematyki zbieżnej z pracą doktorską.

## **4. Podsumowanie i konkluzja końcowa**

Całościowa ocena recenzowanej pracy doktorskiej jest w pełni pozytywna. Do najważniejszych mocnych stron dysertacji należy zaliczyć trafny i aktualny dobór problematyki badawczej, niezwykle kompleksowy program badań empirycznych, biegłe posługiwanie się literaturą przedmiotu oraz umiejętne prowadzenie analizy uzyskanych wyników. Doktorantka udowodniła, że dysponuje dobrym warsztatem badawczym, który umożliwił jej uzyskanie oryginalnych wyników o dużej wartości, zarówno w aspekcie teoretycznym, jak i aplikacyjnym, w szczególności w kontekście poszerzenia wiedzy o roli EPS w ochronie przed toksycznym działaniem jonów cynku zarówno wolnożyjących bakterii *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, jak również podczas ich interakcji z gospodarzem roślinnym, a także możliwości zastosowania tego polimeru w procesach bioremediacji.

Na podkreślenie zasługuje również bardzo dobry dorobek naukowy doktorantki, na który składa się m.in. sześć publikacji naukowych opublikowanych w czasopismach z wysokim IF, w tym dwóch, w których Doktorantka jest pierwszym autorem. Ponadto Doktorantka jest autorem kilkunastu rozdziałów w monografiach oraz kilkudziesięciu doniesień konferencyjnych. W trakcie wykonywania pracy doktorskiej Doktorantka brała również czynny udział w wielu wydarzeniach i warsztatach promujących i popularyzujących wiedzę o biologii i biotechnologii.

Przedstawione przeze mnie drobne uwagi nie zmieniają mojej bardzo wysokiej oceny recenzowanej pracy. Zamieszczone komentarze i pytania nie pomniejszają osiągnięć Doktorantki, co do uzyskanych wartościowych wyników, lecz wynikają z ciekawości naukowej i mają być pomocnymi wskazówkami w realizacji przyszłych przedsięwzięć naukowych.

Reasumując, Doktorantka udowodniła swoją dojrzałość intelektualną jako młody badacz i naukowiec oraz w mojej opinii jest w stanie podjąć się kolejnych wyzwań naukowych. Recenzowana praca pt. „Rola egzopolisacharydu w adaptacji bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* do warunków stresowych wywołanych obecnością jonów cynku” wykonana w Katedrze Genetyki i

Mikrobiologii, Wydziału Biologii i Biotechnologii, Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie pod opieką naukową prof. dr hab. Moniki Janczarek (promotor) oraz dr hab. Jolanty Cieśli (promotor pomocniczy) spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789), zgodnie z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669).

**Biorąc powyższe pod uwagę wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Kopycińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

**Doceniając kompleksowość badań przeprowadzonych przez Panią mgr Magdalenę Kopycińską, a także wysoką wartość naukową i aplikacyjną uzyskanych przez nią wyników, zgłaszam także wniosek o wyróżnienie Jej pracy.**



dr hab. inż. Karol Fijałkowski, prof. ZUT