

dr hab. Anna Szafranek-Nakoneczna
Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
Wydział Nauk Ścisłych i Nauk o Zdrowiu
Katedra Biologii i Biotechnologii Mikroorganizmów

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Anety Kopycińskiej
pt. „Rola egzopolisacharydu w adaptacji bakterii *Rhizobium*
***leguminosarum* bv. *trifolii* do warunków stresowych**
wywołanych obecnością jonów cynku”

Rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Anety Kopycińskiej została wykonana w Katedrze Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Moniki Janczarek oraz promotora pomocniczego dr hab. Jolanty Cieśli.

Ocena problematyki badawczej

Badanie mechanizmów adaptacji mikroorganizmów do czynników stresowych, pojawiających się w środowisku, jest jednym z wiodących nurtów współczesnej mikrobiologii i biotechnologii. Obiektem takich badań są między innymi bakterie z rodzaju *Rhizobium* zdolne do nawiązywania symbiotycznych relacji z roślinami bobowatymi a także do wiązania azotu atmosferycznego i przekształcania go w formę amonową, dostępną dla roślin. Symbioza ta pozwala roślinom na efektywny wzrost w warunkach niedoboru związków azotu w glebie, co ma ogromne znaczenie nie tylko w rolnictwie ale również w przemyśle, ze względu na szerokie wykorzystanie roślin bobowatych. Symbioza pomiędzy roślinami a ryzobiami może być jednak zakłócona przez wiele czynników środowiskowych, w tym zanieczyszczenia, do których zaliczana jest obecność w glebie metali ciężkich, np. cynku. Degradacja i zanieczyszczenie środowiska glebowego to niestety problem globalny, nasilający się w ostatnich latach w związku ze stosowaniem zabiegów agrotechnicznych i industrializacją. Bakterie posiadają jednak zdolność adaptacji do niekorzystnych warunków środowiska przez wykształcenie różnego rodzaju mechanizmów obronnych. Jednym z nich jest wytwarzanie egzopolisacharydu - polimeru stanowiącego naturalną, zewnętrzną barierę ochronną bakterii. Poruszona

w rozprawie tematyka zmierzająca do wyjaśnienia roli egzopolisacharydu (EPS) w ochronie komórek bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* przed stresem powodowanym obecnością jonów cynku jak również w regulacji relacji symbiotycznych ryzobia – rośliny jest zatem interesująca i aktualna. Poza walorem nowości, prezentowane zagadnienia mają również charakter aplikacyjny dlatego podjęcie opisanych w rozprawie badań uważam za w pełni uzasadnione.

Formalna analiza rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Anety Kopycińskiej jest opracowaniem liczącym 182 strony formatu A4, przygotowanym w sposób typowy dla eksperymentalnych prac naukowych a zatem spełnia wszystkie wymagania formalne. Obejmuje **streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp, następnie Hipotezę i cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie i wnioski oraz Bibliografię.** Pracę kończy **Spis rycin, Spis tabel oraz Aneks**, w którym przedstawiony został życiorys naukowy Doktorantki. Na wstępie rozprawy umieszczony został wykaz używanych skrótów. W pracy Doktorantka zamieściła 12 tabel oraz 42 ryciny. Stanowią one ciekawe uzupełnienie części będącej wprowadzeniem w tematykę pracy, natomiast w dalszej części prezentują w przejrzysty sposób uzyskane przez Doktorantkę wyniki. Tytuł rozprawy w pełni odpowiada zawartej w niej treści. Tekst rozprawy został napisany w sposób staranny pod względem językowym i edytorskim co sprawia, że jest interesujący dla czytelnika.

Merytoryczna analiza rozprawy

Pierwszy rozdział rozprawy doktorskiej stanowi **Wstęp** zawierający informacje na temat obecności metali ciężkich w glebach, ze szczególnym uwzględnieniem cynku oraz jego znaczenia dla mikroorganizmów glebowych i roślin, charakterystykę bakterii z rodzaju *Rhizobium* oraz mechanizmów nawiązywania symbiozy przez te bakterie z roślinami a także charakterystykę polisacharydów powierzchniowych produkowanych przez ryzobia, w tym egzopolisacharydu. W dalszej części rozdziału Doktorantka omówiła czynniki abiotycznego stresu środowiskowego (wśród nich metale ciężkie) oraz mechanizmy stosowane przez bakterie do niwelowania ich toksycznego wpływu na komórki bakteryjne. Wskazała również biotechnologiczne możliwości zastosowania ryzobiów oraz egzopolisacharydu w ochronie środowiska i bioremediacji. Wstęp w takiej formie stanowi gruntowne wprowadzenie do tematyki recenzowanej rozprawy, przekonuje również o dobrym, teoretycznym przygotowaniu Doktorantki do realizacji podjętych badań.

Obecność w glebie substancji toksycznych, w tym metali ciężkich, jest poważnym problemem z którym boryka się rolnictwo. Zbyt wysokie stężenia metali mają negatywny wpływ na rośliny oraz mikroorganizmy żyjące z nimi w symbiozie, wśród których ważną grupę stanowią bakterie należące do rodzaju *Rhizobium*. Pomimo licznych badań niewiele jest informacji na temat roli jaką może pełnić egzopolisacharyd w ochronie ryzobiów przed stresem wywołanym obecnością w glebie jonów cynku jak również o wpływie tego polisacharydu na relację bakterie - rośliny. Fakt ten stał się przesłanką do podjęcia badań zmierzających do uzupełnienia wiedzy w tym zakresie a główny cel pracy przedstawiony w rozdziale **Hipoteza i cel pracy**, został poparty celami szczegółowymi, które jednocześnie wyznaczyły etapy realizacji badań.

W kolejnym rozdziale, **Materiały i metody**, Doktorantka zawarła charakterystykę wykorzystanych w pracy szczepów bakteryjnych, których wybór oceniam jako bardzo trafny. Badania prowadzono z wykorzystaniem szczepu dzikiego *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* posiadającego zdolność produkcji egzopolisacharydu (EPS) oraz jego pochodnych zróżnicowanych pod względem tej zdolności (dwa szczepy defektywne w syntezie EPS oraz dwa nadprodukujące EPS). Kolejne podrozdziały rozprawy stanowi wykaz odczynników użytych do doświadczeń oraz charakterystyka podłoży wykorzystanych do hodowli bakterii i roślin. Przegląd metod, które posłużyły do realizacji postawionego celu został przygotowany starannie i przejrzysto. Na podkreślenie zasługuje mnogość zastosowanych metod badawczych i rozbudowany układ eksperymentów, uwzględniających szeroki zakres stężeń jonów cynku. Przeprowadzenie opisanych w rozprawie doświadczeń wymagało dużego zaangażowania Doktorantki oraz wskazuje na jej solidny warsztat badawczy i umiejętność samodzielnej pracy w laboratorium.

Kolejny rozdział, **Wyniki** stanowi omówienie efektów przeprowadzonych badań. Pierwszy etap analiz przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy koncentrował się na określeniu wpływu jonów cynku na własności fenotypowe badanych szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Doktorantka określiła szereg parametrów, takich jak: wpływ jonów Zn^{2+} na przeżywalność i wzrost szczepów, poziom syntezy EPS oraz innych polisacharydów, wytwarzanie biofilmu, agregację i zdolność migracji komórek, wydajność oddychania komórkowego, aktywność dysmutazy ponadtlenkowej oraz katalazy. Ten etap badań, co w mojej ocenie jest bardzo istotne, pozwolił Doktorantce na stwierdzenie, że odporność szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* na obecność jonów cynku jest w znacznym stopniu zależna od ilości syntetyzowanego EPS. Był on dominującym spośród badanych polisacharydów, a jego zwiększona synteza była wynikiem obecności jonów cynku

w środowisku wzrostu bakterii. Większa produkcja EPS skutkowała szybszym tempem wzrostu bakterii, zwiększeniem ich przeżywalności a także wzmożonym tworzeniem biofilmu.

Właściwości fizykochemiczne powierzchni komórek bakterii z rodzaju *Rhizobium* a także skład ich otoczki, stanowią ważny element w procesie adhezji do powierzchni abiotycznych i biotycznych, takich jak korzenie roślin. W kolejnym etapie badań Doktorantka określiła między innymi wpływ jonów cynku na charakter kwasowo-zasadowy otoczek komórkowych, hydrofobowość, zwilżalność oraz ruchliwość elektroforetyczną (EM) komórek *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Otrzymane wyniki pozwoliły na stwierdzenie, że istnieje silny związek pomiędzy produkcją EPS przez szczepy *R. leguminosarum* bv. *trifolii* w różnych warunkach hodowli a właściwościami fizykochemicznymi powierzchni komórek bakteryjnych. Obecność EPS miała istotny wpływ na ruchliwość elektroforetyczną komórek. Wartość bezwzględna EM rosła wraz ze wzrostem ilości syntetyzowanego przez bakterie polimeru, natomiast malała wraz ze wzrostem stężenia jonów Zn^{2+} obecnych w pożywce, co nie było wcześniej prezentowane w literaturze. Ponadto wykazano, że wzrost stężenia jonów cynku skutkowało zwiększeniem hydrofobowości komórek wszystkich badanych szczepów bakterii w stopniu zależnym od ilości syntetyzowanego EPS.

W następnej kolejności Doktorantka omówiła wpływ jonów cynku na relacje symbiotyczne szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* z koniczyną łąkową (*Trifolium pratense*). Warto w tym miejscu wspomnieć, że większość uzyskanych na tym etapie wyników została opublikowana w 2018 roku, w artykule którego Doktorantka jest pierwszym autorem. Praca ukazała się w czasopiśmie *Environmental Microbiology Reports*, zyskała zatem rekomendację specjalistów z tej dziedziny. Otrzymane wyniki wskazują, że jony cynku negatywnie wpływają na kiełkowanie nasion i wzrost koniczyny łąkowej, która jest bardziej wrażliwa na ten czynnik stresowy aniżeli mikrosymbiont. Wykazano także, że cynk może być czynnikiem utrudniającym nawiązywanie efektywnej symbiozy *R. leguminosarum* bv. *trifolii* z koniczyną oraz tworzenie brodawek korzeniowych. Badania te potwierdziły, że szczepy nadprodukujące EPS charakteryzowały się lepszą wydajnością adhezji komórek do korzeni symbionta roślinnego w warunkach stresu wywołanego podwyższonym stężeniem cynku. Tym samym dowiedziono, że obecność EPS jest zarówno kluczowym elementem biorącym udział w ochronie *R. leguminosarum* bv. *trifolii* przed szkodliwym działaniem jonów Zn^{2+} , jak i niezbędnym składnikiem biorącym udział w adhezji tych mikroorganizmów do korzeni gospodarza roślinnego.

Następnie, na podstawie określonej maksymalnej ilości jonów cynku jaka może być zaadsorbowana przez EPS, Doktorantka wskazała, że może być on potencjalnie stosowany w remediacji, jako polimer wiążący jony tego metalu w glebie.

Struktura tego rozdziału potwierdza, iż układ zaplanowanych doświadczeń był logiczny a zasadność każdego etapu wynika z realizacji etapu poprzedniego. Doktorantka zawarła w pracy dużą ilość wyników, które jednak zostały przedstawione w sposób przejrzysty i czytelny za pomocą rycin i tabel.

Kolejny rozdział rozprawy to **Dyskusja**, w której Doktorantka w sposób prawidłowy dokonała interpretacji otrzymanych rezultatów w odniesieniu do danych prezentowanych w publikacjach naukowych z zakresu tematyki poruszanej w rozprawie. Rozdział ten świadczy o swobodnym poruszaniu się Doktorantki w obrębie zagadnień związanych z realizowanymi badaniami.

Następnym rozdziałem pracy jest **Podsumowanie i wnioski**, stanowiące zwięzłe posumowanie uzyskanych rezultatów, zwracające uwagę na potencjał biotechnologiczny czystego preparatu EPS, jak i szczepów charakteryzujących się zwiększoną produkcją tego polimeru w technikach remediacyjnych. Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka sformułowała 10 wniosków odnoszących się do postawionych w rozprawie problemów badawczych.

Wykaz wykorzystanych w trakcie przygotowywania rozprawy źródeł informacji, został zawarty w rozdziale **Bibliografia**, obejmującym 342 pozycje literaturowe, w większości prace eksperymentalne z ostatnich 10 lat, opublikowane w czasopismach o wysokiej randze naukowej. Świadczy to o dużym rozeznaniu Doktorantki w zakresie badanej tematyki i zaangażowaniu w czasie przygotowywania rozprawy doktorskiej.

Do rozprawy załączony został również życiorys naukowy Doktorantki, który potwierdza Jej działalność badawczą (w ramach grantów zewnętrznych i uczelnianych), prace na rzecz uczelni oraz aktywność naukową, której odzwierciedleniem jest współautorstwo w publikacjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym oraz wystąpienia konferencyjne.

Czytając rozprawę nasunęły mi się pewne spostrzeżenia a jako że rolą recenzenta jest wskazanie elementów, które mogłyby być poprawione lub dodane pozwolę sobie o nich wspomnieć:

- zakres przeprowadzonych eksperymentów jest bardzo szeroki i obejmuje wykorzystanie wielu metod badawczych. Z tego względu, w mojej opinii, orientację w tak rozbudowanym układzie doświadczeń ułatwiłby schemat badań zamieszczony na wstępie rozdziału **Materiały i metody**,

- Ryc. 19, na str. 80 jest mało wyraźna,
- na str. 110 wyniki przytaczane w tekście różnią się od tych prezentowanych w Tabeli 9.

Rozprawa jest starannie przygotowana pod względem językowym. Zdarzają się jedynie nieliczne błędy edytorskie i stylistyczne, co w obszernych opracowaniach jest rzeczą naturalną.

Podczas lektury rozprawy doktorskiej pojawiły się też pewne pytania, o odpowiedź na które proszę Doktorantkę:

- Jaki widzi Pani sposób aplikacyjnego wykorzystania uzyskanych wyników?
- Które zagadnienia rozpatrywane w pracy uważa Pani za warte kontynuowania, mając na względzie uzupełnianie wiedzy na temat układu symbiotycznego bakteria-roślina lub reakcji *R. leguminosarum* bv. *trifolii* na stres środowiskowy?

Podsumowanie

Podsumowując niniejszą pracę należy podkreślić, że badanie wpływu jonów metali ciężkich, w tym cynku na ryzobia, jest zadaniem niełatwym ze względu na mnogość czynników środowiskowych wpływających na aktywność bakterii jak również złożone mechanizmy odpowiedzi na czynniki stresowe. Z tego względu rozprawę doktorską Pani mgr Magdaleny Anety Kopcińskiej oceniam bardzo pozytywnie. Punktem wyjścia było właściwe zdefiniowanie problemu, dobór odpowiednich szczepów bakteryjnych zróżnicowanych pod względem wydajności produkcji EPS oraz szeroki zakres badanych stężeń jonów cynku. Zastosowanie odpowiednich narzędzi badawczych pozwoliło natomiast na realizację postawionego celu.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Anety Kopcińskiej pt. „Rola egzopolisacharydu w adaptacji bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* do warunków stresowych wywołanych obecnością jonów cynku” stanowi kompleksowe i oryginalne opracowanie, uzupełniające dotychczasowy stan wiedzy o wpływie jonów cynku na własności fenotypowe oraz symbiotyczne *R. leguminosarum* bv. *trifolii* oraz roli jaką może pełnić EPS w ochronie tych bakterii przed stresem wywołanym obecnością w glebie cynku w stężeniu wyższym niż naturalne. Przygotowana rozprawa doktorska świadczy o naukowej dojrzałości Doktorantki, dużej praktycznej znajomości metod badawczych, umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych, opracowania i interpretacji otrzymanych wyników oraz wnioskowania w oparciu o wiedzę teoretyczną związaną z podjętym tematem badawczym.

Reasumując uważam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wymagania określone w art. 13 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, z późn. zm.). W związku z powyższym, przedkładam Radzie Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie wniosek o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Anety Kopycińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Anna Szafranek-Nakonieczna

dr hab. Anna Szafranek-Nakonieczna