

Prof. dr hab. Katarzyna Hrynkiewicz  
Katedra Mikrobiologii, Instytut Biologii  
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
Lwowska 1, 87-100 Toruń  
Tel. +48 (56) 611-25-40  
E-mail: [hrynk@umk.pl](mailto:hrynk@umk.pl)

Toruń 01.02.2023

#### **Podstawa formalna opinii**

Opinia została sporządzona dla Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

#### **RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

***Mgr Marty Matuszewskiej***

**p.t. „Badanie wpływu glukozy i glicerolu oraz jonów żelaza na syntezę związków przeciwdrobnoustrojowych i formowanie biofilmu przez *Pseudomonas donghuensis* P482”**

w postępowaniu dotyczącym nadania stopnia naukowego doktora  
w dyscyplinie nauki biologiczne

Recenzja została przygotowana w oparciu o wymogi określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce oraz stanowisko recenzenta w sprawie dopuszczenia mgr Marty Matuszewskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

## 1. Opis ogólny

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Marty Matuszewskiej została napisana pod kierunkiem dr hab. Sylwii Jafra, prof. UG, będącej kierownikiem Zakładu Mikrobiologii Roślin na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Struktura pracy jest zgodna z ogólnymi zasadami i wymaganiami stawianymi rozprawom doktorskim. Praca liczy łącznie 159 stron, w skład której wchodzi: abstrakt w języku polskim i angielskim oraz abstrakt popularnonaukowy, wstęp wraz z przeglądem literatury (18 stron), hipotezy badawcze i cele pracy (2 strony), materiały i metody (23 strony), wyniki wraz z 2 Tabelami i 37 Rycinami (57 stron), dyskusja (20 stron) oraz wnioski (1 strona) i literatura (289 pozycji). Liczba, znaczenie i aktualność wykorzystanych referencji oraz sposób pisania potwierdzają praktyczną i teoretyczną wiedzę Doktorantki na temat przedstawianego w rozprawie problemu oraz dużą swobodę w opisywaniu tych niejednokrotnie złożonych i trudnych zagadnień. Większość cytowanych danych pochodzi z prac opublikowanych niedawno, w uznanych specjalistycznych czasopismach naukowych. Praca została napisana w języku angielskim i przygotowana poprawnie pod względem edytorskim. Wyniki zawarte w pracy doktorskiej zostały częściowo zaprezentowane w publikacji Matuszewska i in., 2021 (<https://doi.org/10.1038/s41598-021-90488-w>).

Głównym problemem badawczym rozprawy doktorskiej było zbadanie zależności w modulacji aktywności bakteriobójczej szczepu *Pseudomonas donghuensis* P482 oraz syntezy biobójczych metabolitów i ekspresji genów za nie odpowiedzialnych, a także tworzenia biofilmu w warunkach abiotycznych. Szczegółowe cele pracy zostały przez Doktorantkę przedstawione (w formie trzech punktów) w sposób jasny i nawiązujący do postawionych hipotez (str. 32-33). W pracy zaprezentowano naukowe aspekty poznawcze, które w przyszłości mogą znaleźć zastosowanie aplikacyjne, np. w ochronie roślin przed patogenami. Rozprawa powstała w oparciu o doświadczenia prowadzone w warunkach laboratoryjnych, z wykorzystaniem szerokiego wachlarza dostępnych technik badawczych, które pozwoliły na szczegółową analizę i wyjaśnienie podjętego w pracy doktorskiej problemu naukowego.

## 2. Znaczenie i aktualność zagadnień zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej

Bakterie z rodzaju *Pseudomonas* od wielu lat znajdują praktyczne zastosowanie w ochronie roślin przed patogenami i zwiększaniu ich odporności na stres abiotyczny (praca przeglądowa np. Singh i in., 2022 [<https://doi.org/10.1080/17429145.2022.2029963>]). Wśród różnych aktywności bakterii *Pseudomonas* najszerzej badana jest ich zdolność do wytwarzania licznych pozakomórkowych metabolitów, które mogą stymulować wzrost roślin lub hamować rozwój patogenów, np. sideroforów, jak również tworzenie biofilmu, który jest ważnym czynnikiem podczas kolonizacji roślin. Należy jednak zauważyć, że te aktywności mikroorganizmów mogą być modyfikowane przez różne czynniki abiotyczne, w tym np. obecność dostępnych źródeł węgla lub jonów żelaza w środowisku ich bytowania.

Badany przez Doktorantkę w pracy szczep P482 należący do gatunku *P. donghuensis* został wyizolowany z ryzosfery pomidora. Badania potwierdziły m.in. jego aktywność przeciwbakteryjną (np. przeciwko bakteriom patogennym *Dickeya*, *Pectobacterium*, *P. syringae*) i zdolność do tworzenia biofilmu na korzeniach roślin (ziemniak, kukurydza), wskazując na duży potencjał tego szczepu w biokontroli. Doktorantka, bazując na swoich wcześniejszych obserwacjach uzyskanych podczas realizacji pracy magisterskiej, zanalizowała

w pracy doktorskiej wpływ dwóch źródeł węgla (glukozy i glicerolu – źródła węgla powszechnie występujące w środowisku naturalnym) oraz jonów żelaza(II) i żelaza(III) na aktywność genów związanych z metabolizmem wtórnym i aktywnością bakteriobójczą szczepu *P. donghuensis* P482, które pozwoliły na wyjaśnienie mechanizmów działania tego szczepu i jego potencjalnego wykorzystania w biologicznej ochronie roślin w różnych warunkach środowiskowych. Na szczególną uwagę zasługuje wykorzystanie w badaniach nad metabolitami wtórnymi szczepów techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (HPLC-MS), którą Doktorantka wykonała podczas 3-miesięcznego stażu w *Institute of Sustainable Plant Protection (IPSP-CNR, Portici, NA, Italy)* pod opieką naukową Prof. Francesco Vinale, uznanego naukowca i specjalisty w dziedzinie fitochemii oraz ochrony i uprawy roślin. Doktorantka opracowała również szereg rozwiązań metodycznych, które mogą być wykorzystane w przyszłych badaniach naukowych, zwłaszcza nad bakterią *P. donghuensis* P482, np. skonstruowanie mutantów związanych z metabolizmem żelaza, analiza i opis genów „klastra 17” odpowiedzialnego za aktywność antymikrobiologiczną oraz wyselekcjonowanie genów referencyjnych wykorzystywanych podczas analizy ekspresji genów RT-qPCR.

### 3. Najważniejsze wyniki pracy doktorskiej i ich znaczenie

Do najważniejszych osiągnięć zaprezentowanych w pracy doktorskiej Pani Marty Matuszewskiej zaliczam:

- (i) Wykazanie, że spośród 10 badanych w pracy genów metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping genes*), najwyższą stabilność ekspresji posiadają geny *gyrB*, *rpoD* oraz *mrda*.
- (ii) Wykazanie, że glicerol i żelazo(II) wpływają negatywnie na produkcję 7-HT (hydroksytropolon) i PVD (piowerdyna), zaangażowanych w aktywność przeciwdrobnoustrojową.
- (iii) Wykazanie, że w aktywności bakteriobójczej P482 w obecności glicerolu ważną rolę pełni „klastro 17” (odpowiedzialny za syntezę nieznanego czynnika przeciwdrobnoustrojowego), natomiast geny biosyntezy piowerdyny są istotne niezależnie od źródła węgla obecnego w podłożu (glukoza, glicerol), zaś suplementacja Fe(II) powoduje osłabienie ich aktywności.
- (iv) Wykazanie, że suplementacja Fe(II) ma stymulujący wpływ na formowanie biofilmu przez P482 w podłożu z glicerolem.

Przeprowadzone przez Doktorantkę szeroko zakrojone eksperymenty oraz uzyskane wyniki w istotnym stopniu poszerzają wiedzę naukową, a w przyszłości mogą wpłynąć na udoskonalenie technik stosowanych w rolnictwie z wykorzystaniem biopreparatów opartych na bakteriach z rodzaju *Pseudomonas*. Część wyników została przez Doktorantkę już opublikowana. Mam ogromną nadzieję, że również pozostała część wyników zaprezentowana w pracy doktorskiej zostanie opublikowana w najbliższym czasie w renomowanych czasopiśmie naukowych.

### 4. Podsumowanie

Podsumowując, praca doktorska mgr Marty Matuszewskiej przedstawia szeroko zakrojone i doskonale zaprezentowane wyniki badań, co wpływa na jej ogólny bardzo wysoki

poziom merytoryczny. Liczba moich uwag jest niewielka i nie wpływa na ogólną bardzo dobrą ocenę pracy. Eksperymenty, które przeprowadzono przy użyciu zróżnicowanych technik, przedstawiają szeroki i dobrze zaprezentowany zestaw wyników badań, które zostały bardzo dokładnie przeanalizowane i omówione na podstawie dostępnej literatury naukowej.

## 5. Uwagi

W pracy nie udało się uniknąć kilku drobnych błędów lub niedociągnięć, które wymieniam poniżej:

Uwagi:

1. W numeracji Rysunków brak ciągłości, np. po rysunku oznaczonym 5, kolejny oznaczony jest jako 7 (brakuje rysunku 6); po rysunku oznaczonym jako 8, kolejny oznaczony jest jako 11 (brakuje 9 i 10); brakuje rysunku 9, o którym mowa na str. 63 pracy (wyniki) oraz 10, o którym mowa na str. 64 pracy (wyniki), po rysunku 17 jako kolejny oznaczony jest 20, itd.
2. Zważywszy na liczbę przeprowadzonych doświadczeń i rangę uzyskanych wyników informacje dotyczące ewentualnego praktycznego zastosowania uzyskanych wyników, jak również dalszego kierunku badań w tym temacie zostały przedstawione w bardzo ograniczonej formie. Pewne informacje na ten temat pojawiają się w Dyskusji. Ważne natomiast byłoby podsumowanie najważniejszych osiągnięć i dalszych planów badawczych w tym zakresie.
3. Podczas doświadczenia w którym badano wpływ różnych źródeł węgla (glukoza i glicerol) oraz źródeł żelaza (kontrola – brak związków żelaza, Fe(II), Fe(III)) nie zbadano poziomu syntezy sideroforów wytwarzanych przez szczep *P. donghuensis* P482 oraz jego mutanty (rozdział 9.4.2 – wyniki). Proszę o odniesienie się do tego zagadnienia podczas rozprawy doktorskiej.
4. Wnioski zaprezentowane na str. 134 mają formę podsumowania wyników uzyskanych w pracy doktorskiej. W mojej opinii powinny nawiązywać do hipotez przedstawionych w pracy przedstawionych na str. 32.

## 6. Wnioski

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Marty Matuszewskiej przedstawia szeroko zakrojone i doskonale zaprezentowane wyniki badań, co wpływa na jej ogólny bardzo wysoki poziom merytoryczny. Liczba moich uwag jest niewielka i nie wpływa na ogólną bardzo dobrą ocenę pracy. Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. Wnioskuje do Rady Dyscypliny w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Marty Matuszewskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie jej stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Jednocześnie, zwracam się do Rady Dyscypliny o wyróżnienie pracy doktorskiej za wyróżniającą jakość badań oraz szeroki i nowatorski warsztat metod badawczych

wykorzystanych podczas realizacji doświadczeń, które dostarczyły bardzo szczegółowych danych, a w efekcie w sposób istotny pogłębiły wiedzę w zakresie badań nad mechanizmami warunkującymi biokontrolę roślin przez szczep *P. donghuensis* P482. Wyniki bezpośrednio związane z badaniami realizowanymi w ramach przygotowania rozprawy doktorskiej zostały częściowo opublikowane w prestiżowym czasopiśmie Scientific Reports (Matuszewska i in., 2021; <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90488-w>) [IF = 4.997, MNiSW – 140 pkt], co zgodnie z Regulaminem wyróżniania rozpraw doktorskich uchwalonych przez Radę Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego, warunkuje wnioskowanie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Prof. dr hab. Katarzyna Hrynkiewicz

Handwritten signature of Katarzyna Hrynkiewicz in blue ink.