

Warszawa, dn. 10.10.2024

Dr hab. Tomasz Stępkowski, prof. SGGW
Katedra Biochemii i Mikrobiologii
Instytut Biologii
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
02-776 Warszawa
ul. Nowoursynowska 159

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Damiana Nikodema

pt. „Wpływ wybranych metali ciężkich na interakcje łąbinu wąskolistnego z jego mikrosymbiontami z rodzaju *Bradyrhizobium*”

Przedłożona do mojej oceny praca doktorska mgr inż. Damiana Nikodema została wykonana w Katedrze Biochemii i Biotechnologii, Wydziału Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. Doroty Narożnej, prof. UPP.

1. Struktura rozprawy i znaczenie prezentowanych w niej badań

Rozprawa doktorska mgr inż. Damiana Nikodema obejmuje wyniki badań dotyczących wpływu metali ciężkich na łąbin wąskolistny oraz jego bakteryjne, wiążące azot symbionty należące do rodzaju *Bradyrhizobium*. Licząca 151 stron rozprawa doktorska składa się ze streszczenia w języku polskim i angielskim, wstępu, rozdziału prezentującego cel pracy, rozdziału opisującego użyte materiały i zastosowane metody badawcze, rozdziału prezentującego uzyskane wyniki oraz podsumowanie badań, a także spisu literatury liczącego 142 pozycje. Skład i struktura rozprawy doktorskiej mgr inż. Damiana Nikodema są zgodne z zasadami i wymogami stawianymi tego rodzaju opracowaniom.

Rozprawa doktorska mgr inż. Damiana Nikodema dotyczy bardzo ważnych zagadnień; (1.) biologicznego wiązania azotu mającego miejsce w procesie symbiozy bakterii brodawkowych z roślinami należącymi do rodziny Fabaceae, (2.) obecności w glebie metali ciężkich i ich wpływu na ekosystemy oraz (3.) zastosowania wybranych gatunków Fabaceae oraz ich mikrosymbiontów w procesie bioremediacji obszarów skażonych metalami ciężkimi.

Przedstawione w rozprawie badania koncentrowały się wokół zjawiska biologicznego wiązania azotu zachodzącego w procesie symbiozy łąbinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius*) i jego bakteryjnych symbiontów należących do gatunków *Bradyrhizobium canariense* i *B. japonicum*. łąbin wąskolistny ma największe znaczenie gospodarcze spośród trzech uprawianych w naszym kraju gatunków łąbinu, mimo że skala jego

uprawy jest w Polsce wciąż niewielka. Łubin wąskolistny z uwagi na niskie wymagania glebowe oraz możliwość uprawy na obszarach ubogich w wodę jest rośliną o rosnącym znaczeniu w rolnictwie światowym, m.in. jako uprawa mająca mniejsze wymagania niż soja. Z tego też względu najważniejszym producentem nasion łubinu na świecie jest Australia, gdzie gatunek ten jest uprawiany na obszarach charakteryzujących się ubogimi w azot i fosfor glebami oraz deficytem wody.

Łubin zakażany jest przez ryzobia należące do przynajmniej trzech rodzajów, największe jednak znaczenie w tym procesie odgrywa rodzaj *Bradyrhizobium*. Rodzaj ten charakteryzuje się najszerszym zakresem zakażanych roślin Fabaceae spośród znanych rodzajów bakterii symbiotycznych i uważany jest za najbardziej pierwotny w odniesieniu do symbiotycznego wiązania azotu. Co istotne, badania prowadzone w ostatnich latach, głównie dzięki zastosowaniu podejść metagenomicznych wykazały, iż rodzaj ten należy do dominujących grup bakterii w środowisku glebowym i to niezależnie od występowania w nim roślin Fabaceae. Dalsze badania ujawniły, że rodzaj *Bradyrhizobium* tworzy szereg nieznanych wcześniej asocjacji nie tylko z roślinami, ale również z niektórymi gatunkami zwierząt (np. z koralowcami), występując w różnych, nie tylko środowiskach glebowych. Badania te wskazują na to, że nasze wcześniejsze postrzeganie tego rodzaju przez pryzmat symbiotycznego wiązania azotu z Fabaceae było błędne i że, prawdopodobnie zdecydowana większość komórek *Bradyrhizobium* nie posiada nie tylko genów *nod*, ale również nie ma zdolności do diazotrofii. W tym miejscu muszę jednak stwierdzić, że charakterystyka tego rodzaju została przez Autora potraktowana raczej powierzchownie. Nie zaprezentowano np. aktualnego stanu wiedzy odnoszącego się do szczepów *Bradyrhizobium* infekujących łubin oraz nie przedstawiono informacji o jego adaptacjach do środowisk bogatych w metale ciężkie. **Należy jednak podkreślić podjęte w tej rozprawie znaczenie zagadnienia, jakim jest symbiotyczne wiązanie azotu w kontekście adaptacji obu partnerów symbiozy do środowiska skażonego metalami ciężkimi, a następnie praktycznego wykorzystania tego zjawiska.**

Obecność metali ciężkich stanowi poważne zagrożenie dla wielu ekosystemów, jakości produkowanej żywności oraz zdrowia ludzi i zwierząt. Zagadnienie to było przez wiele lat ignorowane lub traktowane jako niezbędny koszt uboczny rozwoju gospodarczego, w tym procesie industrializacji. Obecnie świadomość dotycząca zagrożeń wynikających ze skażenia środowiska metalami ciężkimi ułatwia prowadzenie badań poprzez ich odpowiednie finansowanie. Badania te umożliwiły podjęcie działań mających na celu ograniczenie zagrożeń ze strony metali ciężkich m.in. na drodze bioremediacji. Warto jednak pamiętać, że o ile możliwa bioremediacja środowisk skażonych ksenobiotykami na drodze selekcji mikroorganizmów mogących je rozłożyć na związki nietoksyczne, o tyle pozbycie się metali ciężkich z zanieczyszczonego obszaru jest praktycznie niewykonalne. To w istocie oznacza, że

należy działać w kierunku ograniczenia użycia metali ciężkich w gospodarce, przede wszystkim rtęci, kadmu, ołowiu, czy arsenu charakteryzujących się najwyższą toksycznością dla środowiska. Celem rozprawy było jednak ustalenie wpływu kadmu – pierwiastka toksycznego nawet w bardzo niskim stężeniu oraz miedzi, niklu i manganu – pierwiastków mających duże znaczenie biologiczne jako metale wchodzące w skład grup prostetycznych szeregu kluczowych dla funkcjonowania komórki enzymów. W wykazano w rozprawie, w odróżnieniu od kadmu, miedź i nikiel stają się toksyczne dopiero w wyższym stężeniu, co dotyczy zwykle ograniczonej liczby środowisk, takich jak hałdy pokopalniane czy okolice hut metali nieżelaznych. Co ciekawe, w pracy tej nie wykazano jednak toksyczności manganu i to nawet w stężeniach, które w naturze zwykle nie występują.

Na szczególną uwagę zasługuje ujęcie w tej rozprawie zjawiska symbiozy łubinu wąskolistnego ze szczepami *Bradyrhizobium* w kontekście właściwości, które nie są zwykle kojarzone z biologicznym wiązaniem azotu. Dotyczy to ich zdolności wytwarzania kwasu indolilo-3-octowego oraz sideroforów. Obie te właściwości należą do stosunkowo często występujących w obrębie bakterii brodawkowych i mogą być postrzegane jako cechy ułatwiające przetrwanie w środowisku ryzosfery oraz szerzej w środowisku glebowym. Tym samym można je uznać za cechy, które wykształciły się, zanim ryzobia nabyły zdolność symbiotycznego wiązania azotu z Fabaceae. Rozprawa obejmuje ponadto analizę zmian mikrobiomu gleby na podstawie amplifikacji wybranych bakteryjnych genów markerowych. **Przedstawiono również wyniki testów odnoszących się do wpływu metali ciężkich na kiełkowanie nasion łubinu wąskolistnego, które wykazały, że użyta odmiana charakteryzuje się znaczną podatnością na działanie metali ciężkich.** Zbadano ponadto ekspresję trzech roślinnych genów markerowych związanych z odpowiedzią rośliny na stres.

2. Omówienie wyników i dyskusji

Eksperymentalna część rozprawy zaczyna się od omówienia wpływu różnych stężeń jonów kadmu, miedzi, niklu i manganu na wybrane szczepy *Bradyrhizobium*. Test obrazujący wzrost płynnych hodowli *Bradyrhizobium* rosnących w obecności jonów metali ciężkich wykazał wysoki poziom oporności na nie, co jest szczególnie interesujące, zważywszy, że badane szczepy były izolowane z brodawek łubinu rosnących na obszarze, na którym nie notowano dotąd skażenia metalami ciężkimi. **Wartym podkreślenia jest też fakt, że szczepy te wykazują oporność porównywalną z niektórymi szczepami ryzobium izolowanymi w miejscach charakteryzujących się wysoką zawartością metali ciężkich (np. na obszarach hałd pokopalnianych).**

Obecność w glebie metali ciężkich wpływa na skład gatunkowy żyjących w niej organizmów. Inaczej mówiąc, metale ciężkie, tak jak i inne czynniki selekcionują gatunki najlepiej do ich obecności przystosowane. Rozprawa zawiera eksperyment polegający na amplifikacji przy użyciu łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) wybranych genów markerowych, z których każdy jest specyficzny dla określonego typu bakterii. Eksperyment ten miał na celu określenie zmian ilościowych w obrębie poszczególnych amplikonów i tym samym ustalić, jak zmienia się społeczność obejmująca dany typy bakterii w próbkach gleby w zależności od stężenia określonego metalu ciężkiego. **W mojej ocenie zastosowana metoda jest mało precyzyjna i nie pozwala na wyciągnięcie daleko idących wniosków odnośnie wpływu poszczególnych metali ciężkich na społeczności bakteryjne w glebie.**

W rozprawie przedstawiono wyniki dotyczące wpływu jonów metali ciężkich na produkcję przez szczepy *Bradyrhizobium* kwasu indolilo-3-octowego. W eksperymencie tym stwierdzono wzrost produkcji kwasu indolilo-3-octowego pod wpływem niewielkich stężeń jonów miedzi, niklu i manganu, a także zahamowanie jego produkcji pod wpływem nawet niewielkich stężeń jonów kadmu. Uzyskane wyniki mogą wskazywać, że kwas indolilo-3-octowy jest wytwarzany w wyniku wzmożonej aktywności metabolicznej będącej wynikiem obecności jonów metali ciężkich w stężeniach zbyt niskich do jej zahamowania. **Wyniki te są interesujące też z tego względu, że o ile katabolizm kwasu indolilo-3-octowego jest cechą rozpowszechnioną w obrębie *Bradyrhizobium*, to zdolność jego produkcji jest cechą znacznie rzadszą.**

Prowadzone badania wykazały też wzrost produkcji egzopolisacharydów w odpowiedzi na obecność metali ciężkich. Reakcja ta ma dość ogólne obronne znaczenia i przypuszczalnie wiąże się z wytwarzaniem biofilmu w reakcji na obecność w środowisku substancji hamujących wzrost komórek. **Zwiększona obecność EPS w hodowli płynnej może jednak prowadzić do błędów w interpretacji odczytów dotyczących ich gęstości optycznej.**

Przeprowadzone testy na produkcję sideroforów wykazały, że jony miedzi i niklu w niewielkich stężeniach mają efekt stymulujący, podczas gdy obecność jonów kadmu prowadzi do obniżenia lub całkowitego zahamowania ich syntezy. Z drugiej strony obecność jonów manganu prowadzi do wzrostu poziomu syntezy sideroforów i to nawet w warunkach wysokiego stężenia tego pierwiastka. Jest to bardzo ciekawa obserwacja. **Autor sugeruje, że wysokie stężenie manganu z uwagi na niską toksyczność tego pierwiastka może indukować zwiększoną syntezę sideroforów jako obronę przed działaniem jonów szkodliwych metali, takich jak glin, miedź, kadm, ołów, cynk, a nawet uran. Nie bez znaczenia jest więc obserwacja wskazująca na wyższy poziom syntezy sideroforów przez badane szczepy *Bradyrhizobium***

canariense w odróżnieniu od szczepów *B. japonicum*. Warto tutaj zaznaczyć, że szczepy *B. canariense* izolowane są głównie z gleb kwaśnych, w których mikroorganizmy narażone są na toksyczną aktywność głównie związków glinu.

Przedstawione w niniejszej rozprawie badania wskazują na wpływ jonów miedzi, niklu i kadmu na morfologię komórek *Bradyrhizobium*. Różnice dotyczyły długości komórek oraz ich powierzchni. Największe zmiany zaobserwowano w przypadku kadmu, którego obecność zaburzała syntezę ściany komórkowej oraz uszkadzała błonę komórkową, najprawdopodobniej poprzez oddziaływania jonów kadmu z białkami obecnymi w obrębie błony komórkowej, przestrzeni peryplazmatycznej oraz membrany zewnętrznej. Nie zaobserwowano takich zmian pod wpływem działania jonów manganu. **Badania te wskazują na mało poznany aspekt wpływu metali ciężkich, jakimi są zaburzenia struktur powierzchniowych komórki bakterii.**

Obecność w środowisku jonów metali ciężkich wpływa na ekspresję szeregu genów, przede wszystkim genów związanych z odpowiedzią na stresi środowiskowe. W rozprawie zawarte są badania ekspresji czterech takich genów; *treS* (koduje syntazę trehalozy), *cueA* (koduje ATPazę typu P związaną z transportem metali przez błonę komórkową), *exoR* (koduje białko regulatorowe kontrolujące syntezę EPS) oraz *fegA* (koduje białko membrany zewnętrznej łączące się z sideroforem), a także genu „wspólnego” nodulacji *nodA* kodującego transferazę acylową. **Analiza ekspresji genów „stresu środowiskowego” ujawniła istotne różnice międzygatunkowe, ale również różnice pomiędzy poszczególnymi szczepami *Bradyrhizobium*.** Zwykle różnice w poziomie ekspresji wiąże się ze znaczącymi różnicami w składzie genowym występującymi nawet w obrębie blisko ze sobą spokrewnionych szczepów. Przyjmuje się, że znaczna część genów ułatwiających przetrwanie komórce ryzobium w środowisku glebowym należy do tzw. genomu zmiennego, tj. tej części genomu, która podlega częstemu transferowi lateralnemu i związanego z tym zjawiskiem nabywania nowych genów, któremu jednak towarzyszy również ich utrata. **Najmniejsze różnice pomiędzy badanymi szczepami *Bradyrhizobium* zaobserwowano w przypadku ekspresji genu nodulacji *nodA*.** Obecność w podłożu metali ciężkich często prowadziła do wzrostu ekspresji tego genu, co potwierdzają też badania innych autorów. Warto tutaj zaznaczyć, że gen *nodA* z uwagi na toksyczne dla komórki właściwości białka NodA ulega ekspresji na stosunkowo niskim poziomie i to jedynie przez stosunkowo krótki czas, jaki jest potrzebny do indukcji merystemu brodawki i rozwoju nici infekcyjnych.

Rozprawa obejmuje też eksperymenty przeprowadzone na roślinnym partnerze symbiozy. Przeprowadzone badania wpływu metali ciężkich na kiełkowanie nasion łąbinu wąskolistnego wykazały zahamowanie tego procesu przez jony miedzi, niklu i kadmu oraz brak takiego efektu w przypadku jonów manganu. W przypadku niskich

stężeń jonów niklu i kadmu zaobserwowano nawet stymulujący wpływ obu tych metali. Badania te wskazują jednak, że zastosowanie łąbinu wąskolistnego w procesach bioremediacji na obszarach silnie skażonych metalami ciężkimi może być utrudnione w związku z brakiem adaptacji tego gatunku (lub użytej odmiany) do takich warunków stresowych.

W rozprawie prezentowane są również badania odnoszące się do wpływu metali ciężkich na proces brodawkowania oraz rozwoju systemu korzeniowego. Wykazano w nich, że obecność jonów metali ciężkich nie prowadzi do zasadniczej redukcji ilości brodawek, co jest zgodne z analizą profili ekspresji genu *nodA*. Można na tej podstawie wysunąć wniosek, że sam proces brodawkowania nie podlega zahamowaniu, o ile stężenie metali ciężkich nie uniemożliwia wzrostu komórek *Bradyrhizobium* oraz samego łąbinu wąskolistnego. Z drugiej strony, rozwój systemu korzeniowego jest pozytywnie skorelowany z poziomem produkcji kwasu indolilo-3-octowego, co sugeruje, że w przypadku tej konkretnej symbiozy bardzo istotną rolę odgrywają też zdolności zwykle niekojarzone z symbiotycznym wiązaniem azotu.

W warunkach stresowych rośliny reagują podwyższoną ekspresją genów, których produkty umożliwiają im przetrwanie. W rozprawie zawarto analizę ekspresji trzech genów markerowych związanych z syntezą fenylopropanoidów; syntazy chalconowej (CHS), syntazy izoflawonowej (IHS) oraz amoniakolizy fenyloalaninowej (PAL). Dwa z tych genów CHS i IHS występują w genomie łąbinu wąskolistnego w więcej niż jednej kopii, co nieco utrudnia interpretację uzyskanych wyników. W założeniu obecność jonów metali ciężkich powinna prowadzić do wzrostu ekspresji tych genów, jako jednej z form odpowiedzi rośliny na stres abiotyczny. Dla przykładu uzyskane wyniki wskazują na spadek poziomu ekspresji genu kodującego amoniakolizę fenyloalaninową pod wpływem badanych metali ciężkich. Największy spadek zanotowano w przypadku miedzi, najmniejszy w przypadku kadmu, ale dopiero kiedy jego stężenie było na poziomie 1 mM. Przypuszczalnie należałoby użyć jeszcze innych genów markerowych związanych z odpowiedzią rośliny na stres abiotyczny.

3. Zagadnienia do przedyskutowania przez Doktoranta

A). Jak można wyjaśnić wysoki poziom oporności badanych szczepów *Bradyrhizobium* na metale ciężkie? Jak powszechna jest to cecha w obrębie tego rodzaju bakterii? W jaki sposób można się o tym przekonać?

B). W jaki sposób można przeprowadzić eksperyment dotyczący wpływu metali ciężkich na społeczności bakteryjne w glebie, przy założeniu, że posiadamy odpowiednie środki finansowe oraz aparaturę?

C). Jak powszechna jest zdolność syntezy kwasu indolilo-3-octowego w obrębie rodzaju *Bradyrhizobium*?

4. Wniosek końcowy

Oceniana przez mnie rozprawa doktorska napisana jest w zwięzły sposób. Zrealizowana tematyka badawcza jest dobrym przykładem wykorzystania szerokiego spektrum technik badawczych, w tym technik mikrobiologicznych, biochemicznych, mikroskopowych oraz technik biologii molekularnej. Należy podkreślić, że Doktorant prawidłowo dobrał metody i techniki w trakcie realizacji podjętej tematyki badawczej, posiadając przy tym umiejętności konieczne do prowadzenia badań naukowych.

Rozprawa doktorska mgr inż. Damiana Nikodema jest opracowaniem wnoszącym istotny wkład w poznanie interakcji ryzobium z roślinami z rodziny Fabaceae. **Szczególne znaczenie ma tutaj zwrócenie uwagi na to, że symbiotyczne wiązanie azotu jest procesem będącym w istocie jedynie niewielką częścią interakcji zachodzących pomiędzy ryzobium a rośliną Fabaceae.** Wynika to przede wszystkim z tego, że przystosowanie ryzobiów do środowiska ryzosfery najprawdopodobniej poprzedzało pojawienie się Fabaceae pod sam koniec mezozoiku. Tym samym, ryzobia zawdzięczają swój sukces ewolucyjny pojawieniu się roślin lądowych przed ponad 400 mln lat.

Podsumowując, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Damiana Nikodema stanowi wartościowe podejście do problemu badawczego, jakim jest wpływ metali ciężkich na interakcje łubinu wąskolistnego z jego mikrosymbiontami z rodzaju *Bradyrhizobium*. Pragnę zaznaczyć, że rozprawa ta spełnia wymagania określone na podstawie art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.) stanowiącą podstawę do nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

Biorąc pod uwagę powyższe, wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie mgr inż. Damiana Nikodema do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.



Dr hab. Tomasz Stępkowski, prof. SGGW