

Lublin, 26.09.2024

prof. dr hab. Magdalena Frąć
Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego
Polskiej Akademii Nauk
Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina
Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej
ul. Doświadczalna 4
20-290 Lublin

Recenzja rozprawy doktorskiej mgra inż. Damiana Nikodema
pt. „Wpływ wybranych metali ciężkich na interakcje łubinu wąskolistnego z jego
mikrosymbiontami z rodzaju *Bradyrhizobium*”

Rozprawa doktorska **mgra inż. Damiana Nikodema** została wykonana w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, pod kierunkiem promotora prof. UPP dr hab. Doroty Narożnej.

1. Formalna ocena rozprawy doktorskiej – struktura rozprawy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgra inż. Damiana Nikodema liczy 151 stron i jest opracowaniem typowym dla eksperymentalnych prac badawczych. Rozprawa zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, hipotezę i cel pracy, materiały i metody, wyniki i dyskusję, podsumowanie i wnioski oraz spis rycin i tabel. Na końcu dysertacji znajduje się literatura, licząca 142 pozycje, które w większości są anglojęzyczne i zostały opublikowane w ciągu ostatnich 10 lat.

Przedstawione w rozprawie doktorskiej zagadnienia podkreślają znaczenie roślin bobowatych, a w szczególności łubinu wąskolistnego, dla agroekosystemów oraz gleby. W rozprawie podkreślono zagadnienia wiązania azotu atmosferycznego przez mikroorganizmy współżyjące z roślinami bobowatymi. Rozprawa zawiera szczegółowe omówienie pierwiastków śladowych i metali ciężkie występujących w glebie, biorąc pod uwagę ich znaczenie dla mikroorganizmów oraz roślin. W pracy omówiono też mikrosymbionty łubinu wąskolistnego, a także mechanizmy adaptacyjne roślin i rizobiów na stres abiotyczny. W ramach wprowadzenia poruszono również zagadnienia wpływu metali ciężkich na rośliny oraz symbiotyczne bakterie glebowe, podkreślając znaczenie parametrów mikrobiologicznych w monitorowaniu jakości środowiska glebowego. Doktorant podkreślił też biotechnologiczne zastosowanie rizobiów oraz łubinu wąskolistnego w ochronie środowiska i bioremediacji, co ma duże znaczenie praktyczne dla poprawy możliwości adaptacyjnych roślin na terenach

zdegradowanych i zanieczyszczonych metalami ciężkimi. Przedstawiona problematyka dysertacji jest bardzo cennym opracowaniem i stanowi bardzo dobre wprowadzenie do wyników zawartych w ocenianej rozprawie doktorskiej. Wobec konieczności poprawy zdrowia i jakości gleb oraz zmniejszenia ilości stosowanych nawozów mineralnych, stoimy przed istotnym wyzwaniem konieczności zrewidowania stosowanych metod uprawy roślin, a tym samym wskazania kierunków zwiększenia różnorodności uprawianych roślin m.in. poprzez wprowadzenie do zmianowania roślin bobowatych, a także ocenę możliwości ich wykorzystania w celach fitoremediacyjnych. Doktorant w swojej dysertacji podkreślił, że sukces fitoremediacji z wykorzystaniem różnych roślin zależy nie tylko od ich tolerancji na metale ciężkie, ale także cech roślin, takich jak tempo wzrostu, wysoka produkcja biomasy czy zdolność akumulacji w niej szkodliwych pierwiastków. Dlatego poruszane zagadnienia stanowią element istotny również z aplikacyjnego punktu widzenia.

Rozprawę doktorską stanowi manuskrypt podzielony na rozdziały i podrozdziały, podkreślający zadania światowego rolnictwa, w tym różnorodność upraw wielofunkcyjnych, takich jak rośliny bobowate, a w szczególności omawia walory łubinu wąskolistnego. Tytuł dysertacji został sformułowany precyzyjnie i odzwierciedla treść rozprawy. Struktura rozprawy jest zgodna z ogólnymi zasadami i wymogami stawianymi tego typu opracowaniom. **Pod względem formalnym wysoko oceniam przedłożoną do oceny rozprawę doktorską.**

2. Znaczenie i aktualność podjętej tematyki badawczej rozprawy

Zapotrzebowanie na żywność, w tym wysokobiałkową, jest jednym z globalnych wyzwań społecznych. Dlatego rośliny bobowate, takie jak łubin wąskolistny, nabierają coraz większego znaczenia gospodarczego, a ponadto ze względu na współzycie z mikroorganizmami, mają duże znaczenie pro-środowiskowe i ekologiczne. Układy symbiotyczne tworzone pomiędzy roślinami bobowatymi i mikroorganizmami należą do istotnych ogniw obiegu azotu w przyrodzie, co sprawia, że tego typu uprawy przyczyniają się do wzbogacenia gleby w azot i mają wpływ na ograniczenie zużycia nawozów mineralnych. Dodatkowo bakterie z rodzaju *Bradyrhizobium* mają pozytywny wpływ na rośliny, powodując stymulację ich wzrostu dzięki udostępnianiu składników pokarmowych oraz biologicznemu zwalczaniu fitopatogenów. Jednym z czynników abiotycznych mających wpływ na mikroorganizmy i rośliny jest obecność metali ciężkich w środowisku glebowym. Zanieczyszczenie gleb metalami ciężkimi niekorzystnie wpływa na bezpieczeństwo

żywnościowe, a także przyczynia się do istotnego zmniejszenia plonów, ograniczając produkcję roślinną. Chociaż badania z tego zakresu prowadzone są od wielu lat, i wiadomo, że mikroorganizmy wykształciły szereg mechanizmów obronnych i adaptacyjnych umożliwiających im przystosowanie do niekorzystnych warunków środowiskowych, to wciąż reakcje mikrobiomu na metale ciężkie nie są w pełni rozpoznane i wymagają prowadzenia badań. Ze względu na fakt, że efekt toksyczności metali ciężkich zależy od dawki oraz może wykazywać odmienne działanie na rośliny i mikroorganizmy, Doktorant podjął badania zmierzające do wyjaśnienia tych interakcji wykorzystując szeroki warsztat badawczy, obejmujący techniki klasycznej mikrobiologii, biologii molekularnej oraz zaawansowanych metod obrazowania elektronowego.

Tematyka badawcza rozprawy doktorskiej ukierunkowana na określenie wpływu jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na bakterie z rodzaju *Bradyrhizobium* wiążące azot atmosferyczny oraz łubin wąskolistny, tworzący układ symbiotyczny z tymi mikroorganizmami, dotyczy bardzo ważnych zagadnień z zakresu ochrony agroekosystemów, przyczyniając się do obniżenia zużycia nawozów mineralnych oraz dostarcza wiedzy z bardzo istotnego obszaru bioremediacji terenów skażonych metalami ciężkimi. Ze względu na to, że degradacja gleb, powodowana zanieczyszczeniem metalami ciężkimi, w wyniku urbanizacji czy nieodpowiedniej gospodarki nawozowej, jest zjawiskiem obserwowanym na całym świecie, stanowiąc zagrożenie dla jakości gleb i roślin, zagadnienia podjęte przez Doktoranta dotyczą ważnych problemów sektora rolniczego, które są aktualne i istotne z punktu widzenia poznawczego i użytecznego. Dokumenty strategiczne Komisji Europejskiej, w tym wyzwania misji glebowej podkreślają konieczność odbudowy zdrowia i jakości gleb, w celu zapewnienia produkcji zdrowej oraz wysokiej jakości żywności. Obserwowana utrata bioróżnorodności oraz konieczność jej odbudowy poruszana w dokumentach promujących rolnictwo regeneracyjne, należą do zagadnień wymagających natychmiastowej interwencji, a jedną z metod wspierających bioróżnorodność roślin w uprawach jest wprowadzanie do zmianowania roślin bobowatych, takich jak łubin wąskolistny, które nie tylko wpływają na gospodarkę azotową, ale także poprawiają strukturę gleby i polepszają zdrowotność roślin, a dzięki symbiozie z bakteriami mają też niebagatelne znaczenie w oczyszczaniu środowiska.

Recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Damiana Nikodema obejmuje badania dotyczące zmian mikrobiomu gleby w wyniku działania różnych stężeń wybranych jonów metali ciężkich oraz określenie ich wpływu na właściwości fenotypowe, biosyntezę

metabolitów i ekspresję wybranych genów bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium* zdolnych do symbiozy z łubinem wąskolistnym, wpisując się w założenia i koncepcje środowiskowe, zwiększające bioróżnorodność roślin oraz przyczyniające się do poprawy stanu gleb zanieczyszczonych i zdegradowanych. Ponadto należy podkreślić, że Doktorant skupił się na określeniu wpływu wybranych jonów metali ciężkich na kiełkowanie, wzrost i ekspresję wybranych genów łubinu wąskolistnego oraz badaniach układów symbiotycznych roślin bobowatych w warunkach stresu abiotycznego spowodowanego obecnością metali ciężkich, co stanowi istotny problem oddziaływania zanieczyszczeń na środowisko glebowe, a w szczególności mikroorganizmy glebowe. Badania podjęte przez Doktoranta należy uznać zatem za celowe i uzasadnione. Poruszane w dysertacji obszary badawcze oraz podjęta tematyka badań przyczyniają się do poszerzenia wiedzy na temat interakcji w układach symbiotycznych roślin bobowatych w warunkach zanieczyszczenia metalami ciężkimi. Tematyka badawcza podjęta przez Doktoranta w ramach ocenianej rozprawy doktorskiej wpisuje się w dziedzinę nauk rolniczych, dyscyplinę rolnictwo i ogrodnictwo.

3. Merytoryczna analiza rozprawy

Recenzowana rozprawa doktorska zawiera bardzo dobrze przygotowaną część wprowadzającą, w której Doktorant opisuje dotychczasowy dorobek naukowy dotyczący metali ciężkich w glebie, znaczenia łubinu wąskolistnego oraz mikrosymbiontów tej rośliny. Doktorant w ten sposób daje wyraz swojej doskonałej orientacji w najnowszych osiągnięciach badawczych nad wpływem metali ciężkich na rośliny oraz symbiotyczne bakterie glebowe. W tej części pracy Doktorant przedstawił również zastosowania biotechnologiczne łubinu wąskolistnego oraz rizobiów, a także ich mechanizmy adaptacyjne na czynniki stresowe. Doktorant omówił i przedyskutował znaczenie biologiczne wybranych metali ciężkich dla mikroorganizmów i roślin, podkreślając zarówno ich działanie katalityczne, jak też toksyczne. Doktorant skupił się również na omówieniu wpływu metali ciężkich na rośliny oraz symbiotyczne bakterie glebowe, podając przykłady bakterii symbiotycznych efektywnych w warunkach stresu wywołanego obecnością metali ciężkich, a także zaprezentował mechanizmy warunkujące tolerancję metali ciężkich przez mikroorganizmy występujące w środowisku glebowym.

Głównym celem ocenianej rozprawy doktorskiej było określenie wpływu jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na obu partnerów symbiotycznych: bakterie z rodzaju

Bradyrhizobium oraz łubin wąskolistny. Zamierzony cel został osiągnięty poprzez szczegółowe i dobrze zaplanowane badania obejmujące dokładne rozpoznanie zależności i interakcji symbiotycznych w tym odpowiedzi roślin na stres spowodowany metalami ciężkimi, badania mikrobiomu gleby poddanej działaniu metali ciężkich czy reakcji mikrosymbiontów na omawiany stres abiotyczny. Warto podkreślić, że część metodyczna rozprawy oraz analiza uzyskanych rezultatów wskazuje, że Doktorant musiał opanować szeroki zakres metod badawczych, obejmujący, metody mikrobiologiczne, biologii molekularnej, biochemiczne, mikroskopowe, a także z obszaru fitotoksyczności. Doktorant zamieścił w dysertacji szczegółowe opisy metodyczne przeprowadzonych analiz, a także zaprezentował przebieg prowadzonych eksperymentów. W wyniku przeprowadzonych badań Doktorant uzyskał wyniki, które dotyczą wyjaśnienia wpływu czynników stresowych w postaci wybranych jonów metali ciężkich na rośliny i ich mikrosymbionty, mając bardzo istotne znaczenie dla poprawy jakości gleb zdegradowanych, głównie zanieczyszczonych metalami ciężkimi. Przeprowadzone badania są bardzo ważne pod względem poznawczym i użytecznym i nie budzą zastrzeżeń natury merytorycznej.

W ramach następnego rozdziału – Wyniki i dyskusja, Doktorant omówił syntetycznie rezultaty uzyskanych badań. Należy podkreślić, że Doktorant prawidłowo scharakteryzował efekty badań, przedstawiając wyniki w sposób uporządkowany i przejrzysty, a także skonfrontował je z danymi literaturowymi. Jednakże w rozdziale tym zabrakło mi wyników analiz statystycznych. Bardzo proszę o omówienie podczas obrony rozprawy doktorskiej zastosowanych metod statystycznych, układów eksperymentalnych oraz liczby powtórzeń wykorzystanych do przeprowadzenia badań.

W pierwszym rozdziale Doktorant skupił się na analizie przeżywalności i wzrostu szczepów bakteryjnych poddanych działaniu jonów metali ciężkich, określając w szczególności gęstość optyczną oraz strefy zahamowania wzrostu bakterii. Doktorant wykazał różnice w działaniu jonów metali ciężkich na testowane szczepy bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium*, przy czym największe zahamowanie wzrostu bakterii zaobserwował przy wyższych stężeniach metali ciężkich w podłożu. Drugi rozdział omawiający wyniki badań skupiał się na określeniu wpływu jonów metali ciężkich na mikrobiom gleby pola uprawnego. Jednak tytuł tego rozdziału jest mylący, ze względu na to, że badania przedstawione w tym rozdziale dotyczyły badań inkubacyjnych polegających na inkubowaniu gleby z dodatkiem jonów metali ciężkich przez 4 tygodnie. Ponadto zastosowana technika PCR pozwala na wykrycie obecności genów, ale trudno wykorzystać ją do ilościowej analizy mikroorganizmów danej grupy i porównania

występowania mikroorganizmów pomiędzy testowanymi próbkami. W tym miejscu nasuwa się pytanie dotyczące wyboru grup mikroorganizmów, których obecność sprawdzał Pan w glebie zanieczyszczonej jonami metali ciężkich. Czym kierował się Pan wybierając te grupy mikroorganizmów Bacteroidetes, β -Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria oraz Bradyrhizobium, czy są one w jakiś sposób wrażliwe lub odporne na jony metali ciężkich? Chciałabym też podkreślić, że kursywą pisane są tylko nazwy gatunkowe i rodzajowe, podczas gdy nazwy innych poziomów taksonomicznych w nomenklaturze bakterii pisane są bez użycia kursywy.

W kolejnych rozdziałach Doktorant przedstawił zdolności bakteryjnych mikrosymbiontów łubinu wąskolistnego do biosyntezy kwasu indolilo-3-octowego, zewnątrzkomórkowych polisacharydów i sideroforów w warunkach stresu abiotycznego związanego z obecnością metali ciężkich w podłożu. Wykazano na ogół obniżenie biosyntezy sideroforów w obecności rosnących stężeń jonów metali ciężkich podczas gdy synteza egzopolisacharydów była stymulowana obecnością wybranych stężeń jonów metali ciężkich. Wykazane przez Doktoranta różnice dotyczące syntezy kwasu indolilo-3-octowego (IAA) w warunkach stresu spowodowanego obecnością metali ciężkich sprawia, że nasuwa się pytanie natury środowiskowej. Jak ocenia Pan te różnice, biorąc pod uwagę miejsce izolacji poszczególnych szczepów bakteryjnych, czy pochodziły one z tych samych roślin lub miejsc izolacji a może są to cechy gatunkowe testowanych bakterii?

W rozdziale 6.6. przedstawiono zmiany morfologiczne komórek bakteryjnych pod wpływem jonów metali ciężkich. Doktorant wykazał, że ekspozycja szczepów bakteryjnych na działanie metali ciężkich powoduje zmiany w morfologii komórek, objawiające się głównie ich kurczeniem, bardziej pomarszczoną powierzchnią i wydłużeniem komórek. W kolejnych rozdziałach Doktorant wskazuje, że jony metali ciężkich mają wpływ na aktywność transkrypcyjną wybranych genów bakteryjnych. Uzyskane wyniki wskazują, że badane szczepy bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium* charakteryzowały się zróżnicowanymi poziomami ekspresji genów, zależnymi zarówno od rodzaju testowanego jonu metalu, jak również od czasu ekspozycji na czynnik stresowy. Proszę odnieść się do uzyskanych wyników ekspresji genów w kontekście możliwości ich praktycznego wykorzystania podczas planowania fitoremediacji terenów skażonych metalami ciężkimi czy też opracowania biopreparatu na bazie testowanych szczepów bakteryjnych.

W ostatnich podrozdziałach tej części dysertacji Doktorant omówił wyniki dotyczące fitotoksyczności określając wpływ metali ciężkich na kiełkowanie nasion łubinu

wąskolistnego, ilość brodawek korzeniowych w układach symbiotycznych, a także systemy korzeniowe łubinu wąskolistnego inokulowanego szczepami *Bradyrhizobium*. W ramach tych badań Doktorant wykazał stymulujące działanie inokulacji nasion na system korzeniowy łubinu wąskolistnego. Ważnym elementem badań było określenie ekspresji wybranych genów ze szlaku syntezy fenylopropanoidów pod wpływem jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu. Rozprawę kończy 11 trafnie sformułowanych wniosków. **W tym miejscu chciałabym poprosić Doktoranta o nakreślenie możliwości, dotyczących praktycznego zastosowania inokulum bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium*, których pozytywne działanie wykazano w dysertacji. Czy są perspektywy na wdrożenie testowanych inokulantów do praktyki rolniczej?** Zaprezentowane w pracy wyniki należy zaliczyć do ciekawych w kontekście agronomicznym i mikrobiologicznym, a także pogłębienia wiedzy na temat oddziaływania metali ciężkich na rośliny bobowate oraz ich mikrosymbionty.

Rozprawa doktorska obejmuje kompleksowe podejście do oddziaływania metali ciężkich na łubin wąskolistny oraz mikrosymbionty tej rośliny, które ukierunkowane są nie tylko na podstawowe aspekty gospodarki azotowej, związane z wiązaniem azotu atmosferycznego, ale także dotyczą ważnych zagadnień fitoremediacji i adaptacji mikroorganizmów i roślin do warunków stresu abiotycznego oraz podkreśla znaczenie mikrobiologicznych parametrów jakości gleby w monitoringu środowiska.

Oceniana rozprawa doktorska napisana jest w sposób zwięzły i treściwy, co nadaje jej spójną całość, będąc przykładem umiejętnego wykorzystania technik mikrobiologicznych, biochemicznych, fitotoksycznych, mikroskopowych, oraz z obszaru biologii molekularnej. Doktorant prawidłowo dobrał metody badawcze, właściwie przeprowadził badania, co umożliwiło zrealizowanie podjętego celu rozprawy doktorskiej. Rozprawa doktorska jest wielowątkowa i starannie opracowana. Analiza przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej wykazała, że Doktorant posiada umiejętność do prowadzenia badań naukowych, a także potrafi analizować i interpretować uzyskane wyniki badań.

4. Wniosek końcowy

Dysertacja doktorska Pana mgr inż. Damiana Nikodema jest opracowaniem wnoszącym istotny wkład w rozwój nauk rolniczych w obrębie dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo. Doktorant zaprezentował dobrą znajomość problematyki rozprawy, opanował

szeroki warsztat badawczy, wykazał umiejętność samodzielnego wykonywania badań naukowych, a także potrafi opracować i zinterpretować uzyskane wyniki badań.

Reasumując, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Pana mgra inż. Damiana Nikodema stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego, dotyczącego wpływu wybranych metali ciężkich na interakcje lubinu wąskolistnego z jego mikrosymbiontami z rodzaju *Bradyrhizobium*, a także spełnia wymagania 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.), stanowiąc podstawę do nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

Wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie mgra inż. Damiana Nikodema do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

prof. dr hab. Magdalena Frąc