

*Dr hab. Dominika Drzewiecka*

*Katedra Biologii Bakterii*

*Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii*

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr **Agnieszki Kowalczyk**, pt. „**Struktury chemiczne O-polisacharydów wybranych szczepów bakterii z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium***”

Praca doktorska Pani mgr Agnieszki Kowalczyk została wykonana w Pracowni Biochemii Strukturalnej Katedry Chemii Biomedycznej, na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, pod kierunkiem Pana dr. hab. Zbigniewa Kaczyńskiego, prof. UG.

Wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej zostały w dużej części opublikowane w postaci trzech artykułów doświadczalnych w czasopiśmie Carbohydrate Research z tzw. listy filadelfijskiej (JCR), o aktualnych współczynniku wpływu (IF) równym 2,975. Jest to czasopismo o uznanej renomie w zakresie publikowania prac naukowych, m.in. odnoszących się do badań struktury, właściwości, funkcji, znaczenia, a także podłoża genetycznego ekspresji polisacharydów różnych drobnoustrojów, w tym lipopolisacharydów. Według oświadczenia Pani mgr Agnieszki Kowalczyk, zamieszczonego w rozprawie, Jej udział we wszystkich tych publikacjach był wiodący. Była Ona pierwszym autorem, wykonała większość opisanych tam prac i analiz, poczynając od ekstrakcji i oczyszczenia lipopolisacharydów z badanych szczepów, poprzez oddzielenie i uzyskanie frakcji polisacharydowych, aż po ustalenie ich struktury chemicznej metodami chromatografii gazowej i spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), co potwierdzili w swych oświadczeniach pozostali współautorzy. Wyniki zostały omówione w przedstawionej rozprawie, która ułożona jest w typowy sposób, przyjęty dla naukowych prac doświadczalnych. Składa się ze zwięzłego wstępu teoretycznego, nakreślonego celu pracy, opisu materiałów i metod wykorzystanych w pracy doktorskiej, omówienia i dyskusji wyników, także tych zawartych w załączonych publikacjach (wraz z oświadczeniami o udziale w nich poszczególnych współautorów), streszczeń po polsku i po angielsku oraz spisu 92 referencji, adekwatnie dobranych do tematu

pracy, w większości aktualnych, choć niektóre artykuły przeglądowe pochodzą sprzed 2010 czy nawet 2000 roku. W rozprawie przedstawiono także wykaz dobrego, całkowitego dorobku naukowego Doktorantki, który obejmuje osiem artykułów naukowych z listy JCR oraz jeden spoza tej listy, osiem doniesień na konferencje międzynarodowe i krajowe, udział w czterech krótkoterminowych stażach zagranicznych i kierowanie czterema corocznymi wewnątrzwydziałowymi projektami dla doktorantów.

Wstęp słusznie skonstruowany został z dwóch zasadniczych części, odnoszących się do tytułowych zagadnień pracy doktorskiej. Autorka w sposób zwarty, jasny i czytelny omawia bakterie z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya* jako patogeny roślin, podaje ich klasyfikację taksonomiczną i analizuje cechy chorobotwórczości, w tym lipopolisacharyd (LPS). Następnie omawia budowę LPS i strukturę chemiczną trzech jego części składowych. Druga część Wstępu pozostawia pewien niedosyt, bo budowa poszczególnych części LPS omówiona jest ogólnie, bez spodziewanych odniesień do opisywanych bakterii. Na przykład nie podano dla jakich bakterii charakterystyczna jest struktura lipidu A, zaprezentowana na rys. 3. Nie możemy się więc dowiedzieć jaki jest aktualny stan wiedzy na temat struktury, klasyfikacji czy wirulencji lipopolisacharydów badanych gatunków bakterii i dlaczego Doktorantka podjęła się analiz, wskazanych w celu pracy. Co prawda wskazuje Ona na możliwość rozprzestrzeniania się bakterii z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium* poprzez wody gruntowe i infekowania roślin, ale nie odnosi zaplanowanych analiz strukturalnych LPS do chorobotwórczości tych bakterii. Autorka nie uchroniła się tu także od drobnych błędów, zwłaszcza w nazewnictwie rzędu „*Enterobacteriales*” (obecnie od 2016 r. *Enterobacterales*) oraz rodziny, do której zaliczane są badane bakterie (poprawnie *Pectobacteriaceae*, ale zamiennie wielokrotnie pojawia się wersja: „*Pectobacteraceae*”), „odporność” (str. 12) – w odniesieniu do bakterii to oporność, „zewnętrzna błona komórkowa” (str. 12) – bakterie Gram-ujemne posiadają dwie odrębne błony: zewnętrzną oraz komórkową. Trudno też zgodzić się z twierdzeniem, że większość bakterii w środowisku rośliny nie ma na nią żadnego wpływu (str. 7), a także, że krótkie LPS „na ogół nie są wirulentne” (str.13) – przecież zawierają lipid A, który stanowi centrum aktywne endotoksyny, jaką jest LPS. Lipid A znany jest jako najbardziej konserwatywny fragment LPS i przypisywanie mu „sporej zmienności” między- i wewnątrzgatunkowej (str. 14) jest raczej nieuprawnione.

Kolejny rozdział pracy, w którym Doktorantka omawia zastosowaną metodykę, jest bardzo szczegółowo i dobrze napisany. Metody opisane są starannie, zrozumiale, jednoznacznie. Ich dobór jest właściwy i logicznie uzasadniony założonym celem i zakresem badań. Oprócz opisu Doktorantka zamieściła także wyczerpujące wprowadzenia, tłumaczące zasadę metody i celowość jej zastosowania. Chcę jedynie zauważyć, że określenie „szczypta” (str. 20 i 23) jest trochę nieprecyzyjne, a nazwa „Część eksperymentalna”, którą zatytułowany został ten rozdział, powinna obejmować także kolejny rozdział, poświęcony wynikom, uzyskanym przecież w efekcie przeprowadzonych eksperymentów.

Fragment pracy, odnoszący się do wyników otrzymanych w kolejnych jej etapach, został skonstruowany tak, że Autorka przedstawiła tok analiz, prowadzących do ustalenia struktury chemicznej powtarzającej się podjednostki O-swoistej LPS, na przykładzie jednego z pięciu badanych w pracy szczepów. Jest to bardzo dobre rozwiązanie, które pozwoliło na szczegółowe i wnikliwe opisanie poszczególnych etapów pracy, a jednocześnie Doktorantka uniknęła wielokrotnego tłumaczenia i opisywania analogicznych analiz wyników, które zostały przecież przedstawione i opublikowane w trzech artykułach doświadczalnych, stanowiących trzon pracy doktorskiej. Zastosowany opis toku badań jest bardzo czytelny, uzupełniony w stosowne wyjaśnienia i uzasadnienia realizowanych kolejno etapów badań. Interesujący wywód Autorki ma kształt dochodzenia, w którym krok po kroku odsłania się przed czytelnikiem ostateczny wynik, ustalony w wyniku logicznie i adekwatnie dobranych kolejnych kroków, metod i wnikliwej dedukcji. W rozdziale tym brakło jedynie wyraźnego wskazania, które wyniki zostały opublikowane w trzech wymienionych artykułach, a które są opisane tylko w przedstawionej dysertacji.

Rozdział „Dyskusja” podsumowuje uzyskane wyniki. Dopiero w tym rozdziale uzyskujemy wiadomości na temat dotychczasowych badań i osiągnięć w zakresie ustalania struktury polisacharydowej części LPS bakterii z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya*. Doktorantka w wyraźny i czytelny sposób zestawia tu w formie tabelarycznej struktury chemiczne powtarzających się jednostek OPS, poznane do tej pory dla dziewięciu szczepów *Pectobacterium* spp. i dwa typy budowy OPS, opisane dotąd dla rodzaju *Dickeya*, włączając w to wyniki przedstawione w recenzowanej rozprawie doktorskiej. Schematyczne ujęcie budowy OPS ułatwia porównanie, znalezienie podobieństw i różnic między poszczególnymi

szczepami w tym zakresie. Na tym właśnie aspekcie koncentruje się Autorka w „Dyskusji”, wskazując ponadto na zidentyfikowane, a rzadko występujące w naturze składniki. Rozdział ten, podobnie jak „Wstęp teoretyczny”, pozostawia pewien niedosyt, brak tu szerszej analizy tematu poprzez bardziej obszerne odniesienia do literatury fachowej, brak porównań do innych rodzajów bakterii, niekoniecznie tylko tych chorobotwórczych dla roślin, czy choćby refleksji Doktorantki na temat trudności bądź sukcesów w Jej własnej drodze badań LPS fitopatogenów bakteryjnych. Takie elementy pojawiły się podczas omawiania części wynikowej, ale to właśnie dyskusja powinna stwarzać pole do dywagacji, przemyśleń, komentarzy, formułowania wniosków – w odniesieniu do osiągnięć innych autorów.

Gwoli uzupełnienia wiadomości zaprezentowanych we Wstępie i Dyskusji uprzejmie zatem proszę Doktorantkę o krótkie przedstawienie stanu wiedzy na temat LPS u innych bakterii chorobotwórczych dla roślin. Chciałabym także zachęcić Panią mgr Agnieszkę Kowalczyk do rozważań na następujący temat: na komórkach bakteryjnych z reguły obecne jest szerokie spektrum cząsteczek LPS o różnych długościach polisacharydów O. Jaka może być przyczyna niewykrycia cząsteczek krótkołańcuchowych po ekstrakcji metodą PCP? Czy rozważano rozdział elektroforetyczny LPS, aby zweryfikować ich obecność?

Poniżej zamieszczam drobne uwagi ogólne, odnoszące się do rozprawy. W tabeli i rycinach, bardzo dobrze ilustrujących kwestie poruszane w części wstępnej i metodycznej, nie podano jednak referencji, podobnie jak w wielu opisanych metodach. Zapożyczone z języka angielskiego zestawienia typu „O-polisacharyd”, „O-antygeny” poprawniej brzmiałyby: polisacharyd O, antygeny O. Angielskie pojęcie: „repeating unit” tłumaczy się raczej jako: jednostka „powtarzająca się”, a nie „powtarzalna”, bo chodzi o jednostkę, która wielokrotnie się powtarza w strukturze polisacharydu O-swoistego, a nie o jednostkę, która jest możliwa do powtórzenia. Nietypowe jest zastosowanie w rozdziale metodycznym i wynikowym czasowników w pierwszej osobie liczby pojedynczej (np. „przygotowałam”), przyjęte jest raczej użycie formy bezosobowej (np. przygotowano) lub przynajmniej pierwszej osoby liczby mnogiej, bo w naukach doświadczalnych opisywane wyniki rzadko są wyłącznym efektem pracy tylko jednego autora, co potwierdza również obecna dysertacja. Jednak chcę podkreślić, że recenzowana rozprawa, z wyjątkiem wspomnianych niewielkich uchybień, napisana jest poprawnym i czytelnym językiem polskim.

Podsumowując moje spostrzeżenia i uwagi do przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Kowalczyk chcę podkreślić, że podjęty cel badań jest ważny, a uzyskane wyniki są dobrej jakości i wnoszą dużo nowej wiedzy w tym stosunkowo mało dotąd poznanym obszarze, jakim jest charakterystyka polisacharydowych struktur zewnątrzkomórkowych bakterii fitopatogennych z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya*. Bakterie te mają często niebagatelny wpływ na uprawy różnego typu roślin, gdyż mogą przynosić wymierne straty gospodarcze, obniżając jakość i wydajność plonów poprzez powodowane choroby roślin uprawnych. Zatem poszerzanie wiedzy na ich temat ma wymiar nie tylko teoretyczny, ale i praktyczny, bo poznanie mechanizmów infekcji, w których uczestniczy lipopolisacharyd, może pomóc w ich ograniczaniu poprzez zapobieganie i eliminację, co podkreśla Autorka w ostatnich zdaniach „Dyskusji” swojej rozprawy doktorskiej. Bakterie z rodzaju *Dickeya* wydają się być dość jednorodne, co może ułatwić zwalczanie powodowanych przez nie chorób, ale już u *Pectobacterium* spp. wykryto stosunkowo dużą zmienność polisacharydów budujących LPS, co jest typowe dla tego ważnego składnika błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych. Są tu jednak niezbędne dalsze badania kolejnych izolatów tych fitopatogennych pałeczek, pochodzących z wody i roślin. Mam więc nadzieję, że ten istotny temat badawczy, który rozwinęła Doktorantka, będzie kontynuowany. Moje sugestie, pytania czy uwagi, wynikające z obowiązków recenzenta, mają wywołać refleksję o potrzebie odpowiedniego umotywowania i podsumowania prowadzonych badań, ale w żadnym stopniu nie poddają w wątpliwość istotności celu pracy ani jakości uzyskanych w niej ważnych wyników.

Biorąc zatem pod uwagę przedstawioną wyżej charakterystykę recenzowanej rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Kowalczyk, pt. „Struktury chemiczne O-polisacharydów wybranych szczepów bakterii z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium*” i jakość naukową opisanych w niej wyników uważam, że spełnia ona warunki stawiane rozprawom na stopień doktora. Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

