

Lublin, 22.03.2023

prof. dr hab. Magdalena Frąc
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 mgr Magdaleny Świecimskiej

pt. „*Promieniowce wyizolowane z gleb środowisk ekstremalnych i mało poznanych – różnorodność taksonomiczna i aktywność biologiczna*”

Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Świecimskiej została wykonana na Wydziale Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod opieką promotora dr hab. Patrycji Golińskiej, prof. UMK oraz promotora pomocniczego dr Magdaleny Wypij. Recenzja została wykonana na zlecenie Dziekana Wydziału – prof. dr hab. Justyny Rogalskiej.

1. Ocena problematyki badawczej rozprawy

Recenzowana rozprawa doktorska mgr Magdaleny Świecimskiej dotyczy badań nad promieniowcami wyizolowanymi z silnie wysuszonych i nasłonecznionych gleb pustyni Atakama, zasolonych gleb jeziora Lonar oraz gleb kwaśnych lasu sosnowego, ze szczególnym uwzględnieniem właściwości i aktywności tych mikroorganizmów, w celu ustanowienia kolekcji szczepów promieniowców o dużym potencjale biotechnologicznym. Głównym celem badań Doktorantki było określenie rodzajowej różnorodności promieniowców występujących w mało poznanych i ekstremalnych siedliskach oraz charakterystyka ich aktywności biologicznej do potencjalnego zastosowania biotechnologicznego w medycynie, przemyśle i rolnictwie.

Promieniowce należą do mikroorganizmów bardzo szeroko rozpowszechnionych w ekosystemach naturalnych, a gleba jest jednym z podstawowych źródeł występowania tych zróżnicowanych, polimorficznych, Gram-dodatnich bakterii. Ze względu na swoje właściwości promieniowce uczestniczą w rozkładzie materii organicznej i obiegu pierwiastków w środowisku, a także mają zdolność do syntetyzowania metabolitów o

działaniu przeciwdrobnoustrojowym, produkcji enzymów czy elicytorów wywołujących indukcję odporności u roślin, co stawia te mikroorganizmy w grupie bardzo interesujących pod względem dużego potencjału aplikacyjnego w rolnictwie. Ponadto, mikroorganizmy z grupy promieniowców znane są z produkcji antybiotyków oraz innych bioaktywnych metabolitów, w tym związków o działaniu przeciwnowotworowym, a także są źródłem enzymów do zastosowania w wielu gałęziach przemysłu, w tym rafineryjnego, spożywczego, farmaceutycznego czy papierniczego, co sprawia, że mają one bardzo duży potencjał do praktycznego wykorzystania w obszarze biotechnologii. Chociaż od bardzo wielu lat prowadzone są intensywne prace badawcze nad promieniowcami, to heterogeniczność tej grupy mikroorganizmów i różnorodność środowisk, z których mogą być pozyskane sprawia, że problematyka związana z poszukiwaniem nowych efektywnych bio(techno)logicznie izolatów promieniowców jest niezwykle aktualna. Należy podkreślić, że aktualna tendencja zmierzająca do zwiększenia potrzeby biologizacji rolnictwa oraz rozwoju innych gałęzi przemysłu w kierunku bardziej ekologicznym i zrównoważonym sprawia, że podjęte przez Doktorantkę badania wpisują się w najnowsze trendy badawcze, prezentowane w dokumentach strategicznych Unii Europejskiej.

Biorąc pod uwagę znaczenie badań z teoretycznego i aplikacyjnego punktu widzenia, a także aktualne kierunki badawcze podkreślane w światowych, unijnych i krajowych dokumentach strategicznych, uważam podjęcie przez Panią mgr Magdaleną Świecimską badań ukierunkowanych na problematykę poszukiwania nowych, istotnych gospodarczo i biotechnologicznie szczepów promieniowców za celowe i w pełni uzasadnione.

2. Formalna ocena rozprawy – struktura dysertacji

W skład przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej wchodzi spójny tematycznie zbiór siedmiu artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych:

- **Świecimska M**, Golińska P, Goodfellow M. Generation of a high quality library of bioactive filamentous actinomycetes from extreme biomes using a culture-based bioprospecting strategy. *Front Microbiol*, 2022 (zaakceptowano 28.12.2022r.). Doi:10.3389/fmicb.2022.1054384.
- Golińska P, Montero-Calasanz MDC, **Świecimska M**, Yaramis A, Igual JM, Bull AT, Goodfellow M. *Modestobacter excelsi* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a

- high altitude Atacama Desert soil. *Syst Appl Microbiol* 2020; 43:126051. Doi: 10.1016/j.syapm.2019.126051.
- Golińska P, **Świecimska M**, Montero-Calasanz MDC, Yaramis A, Igual JM, Bull AT, Goodfellow M. *Modestobacter altitudinis* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from Atacama Desert soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 2020; 70:3513-3527. Doi: 10.1099/ijsem.0.004212.
 - **Świecimska M**, Golińska P, Nouioui I, Wypij M, Rai M, Sangal V, Goodfellow M. *Streptomyces alkaliterrae* sp. nov., isolated from an alkaline soil, and emended descriptions of *Streptomyces alkaliphilus*, *Streptomyces calidiresistens* and *Streptomyces durbertensis*. *Syst Appl Microbiol* 2020; 43:126153. Doi: 10.1016/j.syapm.2020.126153
 - **Świecimska M**, Golińska P, Wypij M, Goodfellow M. Genomicbased classification of *Catenulispora pinisilvae* sp. nov., novel actinobacteria isolated from a pine forest soil in Poland and emended description of *Catenulispora rubra*. *Syst Appl Microbiol* 2021; 44:126164. Doi: 10.1016/j.syapm.2020.126164.
 - **Świecimska M**, Golińska P, Wypij M, Goodfellow M. *Catenulispora pinistramenti* sp. nov., novel actinobacteria isolated from pine forest soil in Poland. *Int J Syst Evol Microbiol* 2021; 71:5063. Doi: 10.1099/ijsem.0.005063.
 - **Świecimska M**, Golińska P, Goodfellow M. Genome-based classification of *Streptomyces pinistramenti* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a pine forest soil in Poland with a focus on its biotechnological and ecological properties. *Antonie van Leeuwenhoek* 2022; 115:783-800. Doi: 10.1007/s10482-022-01734-8.

W pięciu publikacjach Doktorantka jest pierwszą autorką, w jednej drugą i w jednej trzecią, a z przedstawionych oświadczeń Doktorantki i współautorów wynika, iż Jej rola w przygotowaniu tych prac była wiodąca. We wszystkich publikacjach z pierwszym autorstwem Doktorantki uczestniczyła Ona w zaplanowaniu badań, samodzielnie przeprowadziła wszystkie doświadczenia eksperymentalne, a także dokonała analizy uzyskanych wyników i przygotowała pierwsze wersje manuskryptów. Ponadto, z przedstawionych oświadczeń określających indywidualny wkład Doktorantki wynika, że w pracach, w których nie jest pierwszą autorką, współuczestniczyła w przeprowadzeniu analiz filogenetycznych, filogenomowych i fenotypowych, a także miała udział w analizie genomów, wyników badań i przygotowaniu manuskryptu.

Publikacje umieszczone w rozprawie doktorskiej objęto wspólnym tytułem „Promieniowce wyizolowane z gleb środowisk ekstremalnych i mało poznanych -

różnorodność taksonomiczna i aktywność biologiczna”, a pracy, złożonej z VIII rozdziałów, nadano strukturę obejmującą: **wstęp (I)**, w którym umieszczono charakterystykę promieniowców i zagadnienia związane z ich taksonomią, **cel pracy i hipotezy badawcze (II)**, **materiały i metody (III)**, **publikacje wchodzące w skład rozprawy (IV)**, gdzie umieszczono siedem artykułów naukowych, **dyskusję i podsumowanie uzyskanych wyników (V)**, **wnioski (VI)**, **literaturę (VII)** oraz **życiorys naukowy (VIII)**. Wstęp poprzedzony jest wykazem skrótów oraz **streszczeniami w języku polskim i angielskim**. Praca w takim układzie liczy 258 stron. Tytuł ocenianej rozprawy doktorskiej jest precyzyjny i w pełni odpowiada jej treści, którą stanowi cykl powiązanych tematycznie, wymienionych powyżej, siedmiu publikacji naukowych. **Do rozprawy doktorskiej zostały dołączone również oświadczenia doktorantki i pozostałych współautorów publikacji. Umieszczony na końcu dysertacji życiorys naukowy** Doktorantki wskazuje, że tematyka badań zbliżonych do zagadnień, które obejmuje rozprawa doktorska, była szeroko publikowana przez Doktorantkę (6 dodatkowych publikacji w czasopismach naukowych, 18 komunikatów konferencyjnych, w tym 2 wyróżnione), a także finansowana w ramach grantów naukowych UMK dla młodych pracowników i doktorantów. Doktorantka włączała się również w działalność dydaktyczną uczelni, a także popularyzatorską i organizacyjną. Oznacza to, że Doktorantka jest osobą bardzo aktywną i zaangażowaną w podejmowane przez Nią zadania, co zasługuje na uznanie. **Wysoko oceniam przygotowanie rozprawy doktorskiej pod względem formalnym.**

3. Merytoryczna analiza rozprawy

Pierwszym rozdziałem rozprawy jest **Wstęp**, w którym Doktorantka przedstawiła charakterystykę promieniowców w ujęciu aplikacyjnym, podkreślając rolę i znaczenie tych organizmów w środowisku, medycynie, rolnictwie oraz różnych gałęziach przemysłu. Doktorantka nakreśliła znaczenie podjętej tematyki badań, odnosząc się do różnych grup promieniowców, w tym występujących w środowiskach ekstremalnych, takich jak alkaliczne pustynie i jeziora sodowe, a także siedliska kwaśne z uwzględnieniem gleb leśnych i torfowych, jak również omówiła zdolności adaptacyjne promieniowców do różnych środowisk. Istotnym aspektem przedstawionego we wstępie przeglądu literatury jest omówienie aplikacyjnego potencjału biotechnologicznego promieniowców w zależności od środowiska, z którego zostały wyizolowane. Na uwagę zasługuje przedstawienie nie tylko

metabolitów syntetyzowanych przez te mikroorganizmy, ale również analiza ich genomów oraz charakterystyka składu taksonomicznego zbiorowisk promieniowców występujących w różnych środowiskach. Istotny element wprowadzenia czytelnika w tematykę podejmowanych badań stanowi również omówienie taksonomii promieniowców, uwzględniające zarówno metody klasycznej różnorodności morfologicznej i chemotaksonomicznej, jak również różnic molekularnych pomiędzy poszczególnymi taksonami, z uwzględnieniem technik filogenetyki molekularnej. Ta część rozprawy doktorskiej wprowadza w zagadnienia, a w szczególności publikacje umieszczone w dysertacji, uwzględniając informacje zamieszczone w przeglądzie literatury poszczególnych artykułów naukowych, wchodzących w skład pracy.

Drugi rozdział obejmujący cel pracy i hipotezy badawcze został sformułowany w sposób precyzyjny, łącząc dobrze dwa aspekty: poznawczy i aplikacyjny. Aspekt poznawczy dotyczy określenia rodzajowej różnorodności i przynależności testowanych promieniowców do znanych lub potencjalnie nowych gatunków. Celem użytecznym jest ustanowienie kolekcji szczepów promieniowców o dużym potencjale biotechnologicznym do wykorzystania w medycynie, przemyśle i rolnictwie. **Cel pracy został sformułowany poprawnie, wyznaczając wyraźnie kierunek badań, a zakres pracy przedstawiony w kolejnych publikacjach jest adekwatny do przyjętego celu badań.** Doktorantka w rozdziale tym przedstawiła również hipotezy badawcze, które w kolejnych rozdziałach rozprawy są weryfikowane poprzez powiązane ze sobą w logiczny sposób etapy prowadzonych badań.

Kolejny rozdział rozprawy **·Materiały i metody** obejmuje opis metod badawczych wykorzystanych w kolejnych artykułach naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Rozdział ten obejmuje opis analizy taksonomicznej i aktywności biologicznej izolatów promieniowców, analizy taksonomicznej potencjalnie nowych gatunków, analizy sekwencji powtarzalnych BOX techniką PCR, a także charakterystykę właściwości fenotypowych testowanych szczepów promieniowców. W tej części pracy przedstawiono metodykę przeprowadzonych analiz chemotaksonomicznych w zakresie oznaczania cukrów komórkowych, izomeru kwasu diaminopimelinowego, profilu chinonów izoprenoidowych oraz lipidów polarnych. Opisano również metodykę analiz morfologicznych uwzględniającą morfologię komórek, zarodników i strzępek zarodnikonośnych, badania właściwości fizjologicznych z wykorzystaniem klasycznej metody hodowlanej, a także biochemicznych i degradacyjnych. **W rozdziale tym, jak również w poszczególnych artykułach naukowych, szczegółowo omówiono metody i procedury badań mikrobiologicznych, molekularnych i**

biochemicznych. Doktorantka jasno i precyzyjnie opisała zastosowane metody i techniki badawcze. Na podkreślenie zasługuje szeroki zakres dobranych testów i oznaczeń, zapewniający przeprowadzenie kompleksowych badań promieniowców, w celu charakterystyki ich potencjału biotechnologicznego oraz przynależności do odpowiednich taksonów.

Następnie w pracy umieszczone zostały poszczególne publikacje, poprzedzone ich wykazem. Zostały one przedstawione powyżej i stanowią kompleksową analizę szeregu szczepów promieniowców. Prace dostarczają nowych informacji z zakresu filogenetyki, a także poszerzają wiedzę odnośnie aktywności antymikrobiologicznej promieniowców czy ich właściwości antagonistycznych wobec grzybowych i grzybopodobnych patogenów roślinnych. W publikacjach poruszone są także kwestie wykorzystania promieniowców oraz ich właściwości promujących wzrost i rozwój roślin oraz syntezy enzymów hydrolitycznych. W rozdziale Dyskusja i podsumowanie uzyskanych wyników Doktorantka syntetycznie omówiła najważniejsze wyniki poszczególnych przeprowadzonych prac badawczych, które zostały opublikowane w ramach siedmiu artykułów naukowych. Na podkreślenie zasługuje szeroki zakres badań molekularnych przedstawicieli różnych grup kolorystycznych promieniowców, które sugerują, że testowane izolaty tych bakterii mogą być rozważane jako potencjalnie nowe gatunki rodzajów *Actinacidiphila*, *Actinospica*, *Kribbella*, *Nocardia*, *Nocardiopsis*, *Pilimelia*, *Pseudonocardia*, *Streptacidiphilus* i *Streptomyces*. Uzyskane wyniki wskazują, że ze 115 zebranych izolatów 79 wykazywało aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec co najmniej jednego potencjalnie patogenicznego szczepu bakterii lub drożdży *C. albicans*. Większą aktywność promieniowców zaobserwowano wobec bakterii Gram-dodatnich niż bakterii Gram-ujemnych. Promieniowce kwaśnych gleb leśnych charakteryzowały się silną aktywnością wobec potencjalnie fitopatogenicznych grzybów i grzybopodobnych lęgniowców, przy czym 62 z 71 testowanych izolatów wykazywało co najmniej 50% stopień zahamowania wzrostu dla co najmniej jednego z analizowanych fitopatogenów. Testowane izolaty promieniowców ze wszystkich środowisk badanych w ramach rozprawy doktorskiej wykazały aktywność enzymatyczną, obejmującą wytwarzanie celulaz, chitynaz, lipaz i proteinaz, natomiast wytwarzanie pektynaz zaobserwowano tylko dla izolatów pochodzących z pustyni Atakama. Z kolei największy odsetek szczepów wykazujących zdolność do promowania wzrostu roślin odnotowano dla promieniowców wyizolowanych z gleb leśnych. Uzyskane wyniki są bardzo cenne z biotechnologicznego punktu widzenia, gdyż dają duży potencjał użytkowy zebranej kolekcji promieniowców do

zastosowania w rolnictwie i innych gałęziach gospodarki. Bardzo istotnym elementem badań podstawowych wykonanych przed Doktorantką jest identyfikacja i kompleksowa analiza szczepów promieniowców, które wykazały, że testowane izolaty należały do rzadkich rodzajów promieniowców o różnej aktywności biologicznej wskazując, że stanowią one potencjalnie nowe gatunki. Niezwykle interesującą częścią badań prowadzonych przez Doktorantkę są wyniki umieszczone w publikacjach, obejmujące analizę genomów nowych gatunków promieniowców. Wygenerowanie i zebranie tak obszernych wyników w mojej ocenie jest jednocześnie wyznacznikiem dalszych prac badawczych, które mogłyby być kontynuowane i rozwijane na kolejnych etapach pracy naukowej Doktorantki. W tym kontekście na podkreślenie zasługują badania genów stresu związanych z przystosowaniem promieniowców do życia w ekstremalnym lub nietypowym środowisku. Obecność genów odpowiedzi na stres środowiskowy może bowiem ułatwiać mikroorganizmom zasiedlanie środowisk trudnodostępnych, zapewniając przewagę w zasiedlaniu danej niszy ekologicznej. Kolejnym ciekawym i istotnym elementem badań była próba określenia biosyntetycznych klastrów genowych kodujących metabolity wtórne. Doktorantka dla niektórych testowanych izolatów promieniowców wykazała obecność w genomie od 24 do 31 klastrów genów kodujących metabolity wtórne, głównie siderofory, terpeny, nierybosomalne peptydy czy syntazy poliketydowe. Badania wykazały również występowanie w genomach testowanych promieniowców klastrów genów kodujących nieznane dotąd związki, co również w mojej ocenie stanowi materiał i może wyznaczać kierunek dalszych prac badawczych.

W rozdziale Wnioski Doktorantka sformułowała osiem trafnych wniosków, a także odniosła się do weryfikowanych hipotez badawczych udowadniając, że izolaty promieniowców pochodzących z gleby pustyni Atakama, jeziora Lonar i lasu sosnowego są zróżnicowane taksonomicznie i mogą stanowić potencjalnie nowe gatunki promieniowców. Wielofazowa analiza wybranych izolatów wyodrębniła 6 nowych gatunków promieniowców z rodzaju *Catenulispora*, *Modestobacter* i *Streptomyces*, co stanowi ważne osiągnięcie z zakresu badań podstawowych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pokazuje szeroki zakres badań, potwierdzając opanowanie przez Doktorantkę warsztatu badawczego obejmującego różne techniki badawcze i pomiarowe, a forma rozprawy wskazuje, że Doktorantka potrafi przedstawić wyniki oraz je omówić w taki sposób, aby zostały docenione przez środowisko naukowe poprzez opublikowanie w uznanych periodykach naukowych, co stanowi wielką zaletę i stawia Doktorantkę w grupie osób bardzo dobrze

przygotowanych do pracy naukowej. Doktorantka umiejętnie i prawidłowo opracowała bardzo obszerny materiał badawczy obejmujący dużą ilość wyników, które zostały szczegółowo opisane w uporządkowany i przejrzysty sposób w poszczególnych publikacjach oraz syntetycznie przedstawione w podsumowaniu dysertacji.

Podczas czytania i analizy rozprawy nasunęły mi się pytania, które chciałabym zadać Doktorantce podczas obrony rozprawy doktorskiej, które przedstawiam poniżej, podkreślając, że mają one charakter dyskusyjny:

- Czy analiza genomów nowych gatunków promieniowców została wykonana samodzielnie przez Doktorantkę, czy w ramach usługi zewnętrznej? Bardzo proszę o syntetyczne przedstawienie głównych założeń i etapów tej analizy podczas obrony rozprawy doktorskiej.
- Czy Doktorantka posiada charakterystykę mikrobiomu badanych gleb, z których pozyskano testowane w badaniach izolaty lub czy znane są wyniki badań innych autorów z tego zakresu? Uważam, że ciekawym aspektem badań byłoby połączenie charakterystyki mikrobiomu różnych środowisk, jako testów skryningowych lub predykcyjnych, wykorzystywanych w selekcji siedlisk, z których można pozyskać izolaty mikroorganizmów o dużym potencjale biotechnologicznym. Proszę o opinię Doktorantki w tej kwestii podczas obrony rozprawy doktorskiej.
- Ze względu na to, że wiele z testowanych przez Doktorantkę szczepów wykazało potencjał do ochrony oraz promowania wzrostu roślin, bardzo proszę o informację dla jakich roślin oraz dla ich ochrony przed jakimi fitopatogenami rekomendowała by Pani zastosowanie przez Panią izolatów promieniowców?
- Czy znane są Doktorantce z literatury lub praktyki sposoby wykorzystania promieniowców w rolnictwie, jakie metody namnażania, stabilizacji oraz jakie formułacje wykorzystywane są w preparatach dla rolnictwa opartych o szczepy promieniowców? Czy widzi Pani możliwość rozwoju prac badawczych w kierunku opracowania efektywnych w rolnictwie i ogrodnictwie biopreparatów z wykorzystaniem izolatów zgromadzonych w stworzonej przez Panią kolacji promieniowców?

4. Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego, dotyczącego kompleksowej charakterystyki izolatów promieniowców pochodzących z gleb pustyni Atakama, jeziora Lonar i lasu sosnowego, co

pozwoili na stworzenie kolekcji szczepów o różnej aktywności biologicznej i potencjale biotechnologicznym. Jakość rozprawy naukowej oraz załączony w formie aneksu życiorys naukowy Doktorantki stawiają Panią mgr Magdalenę Świecimską w gronie ambitnych młodych badaczy.

Doktorantka opanowała warsztat badawczy z zakresu mikrobiologii, biologii molekularnej i biochemii, wykazała umiejętność samodzielnego prowadzenia eksperymentów naukowych, a także zdolność do opracowania i interpretacji uzyskanych wyników, jak również w cyklu artykułów naukowych zaprezentowała bardzo dobrą znajomość problematyki badawczej, stanowiącej rozprawę doktorską. Dysertacja doktorska Pani mgr Magdaleny Świecimskiej jest opracowaniem wnoszącym istotny wkład w rozwój nauk ścisłych i przyrodniczych w obrębie dyscypliny nauk biologicznych.

Pragnę stwierdzić, że rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Świecimskiej spełnia warunki wymagane Ustawą z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595), z późniejszymi zmianami z dnia 18 marca 2011 roku (Dz. U. Nr 84, poz. 455), w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. poz. 1669) i wnioskuję o jej dopuszczenie do publicznej obrony.

Biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny rozprawy, przeprowadzenie kompleksowych badań, które zostały opublikowane w siedmiu artykułach naukowych w uznanych periodykach naukowych, a także połączenie badań podstawowych, w tym wyodrębnienie sześciu nowych gatunków promieniowców, z aspektem użytkowym obejmującym stworzenie kolekcji szczepów mikroorganizmów o potencjale biotechnologicznym wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.


prof. dr hab. Magdalena Frąc

Lublin, 22.03.2023