

Lublin, 22 czerwca 2021 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej****Pani magister Sylwii Szulcy****„Badania strukturalne O-polisacharydów wyizolowanych z bakterii *Franconibacter helveticus*,  
*Pseudomonas donghuensis* oraz *Pectobacterium brasiliense*”**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Zespole Biochemii Strukturalnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Promotorem rozprawy Pani mgr Sylwii Szulcy jest dr hab. Zbigniew Kaczyński, prof. UG.

Recenzowana praca doktorska liczy 131 stron. Praca jest napisana w języku polskim i zaopatrzona w streszczenia w języku polskim oraz angielskim. W rozprawie umieszczono 79 podpisanych rycin oraz szereg wzorów półstrukturalnych włączonych do tekstu, zaś rozdział IV, poświęcony opisowi stosowanych przez Kandydatkę metod, rozpoczyna całostronicowy schemat postępowania obrazujący wszystkie etapy zaplanowanych badań. Ryciny są starannie dobrane i wykonane. Zamieszczenie ich ułatwia lekturę rozprawy i dobrze ilustruje omawiane zagadnienia. Praca doktorska Pani mgr Sylwii Szulcy zawiera także 8 tabel. Układ pracy jest typowy i niewiele odbiega od schematu przyjętego dla prac doświadczalnych. Rozprawa Pani mgr Sylwii Szulcy zawiera: dwa **Streszczenia** (wersję polską i angielską), dwustronicowy **Wykaz skrótów**, a także dwustronicowy **Wstęp**, który jest bardzo pobieżnym wprowadzeniem czytelnika w świat tych bakterii, z których pozyskano preparaty do badań. Kolejny rozdział nosi tytuł: **Część teoretyczna**, jednak z rozważaniami teoretycznymi dotyczącymi zagadnień biologicznych czy mikrobiologicznych ma niewiele wspólnego. Bardziej adekwatnym wydaje się opatrzenie go tytułem **Wprowadzenie w zagadnienia badawcze objęte tematem dysertacji**. Doktorantka podzieliła **Część teoretyczną** na szereg podrozdziałów. Cztery pierwsze podrozdziały zawierają informacje literaturowe dotyczące trzech rodzajów mikroorganizmów wymienionych w tytule rozprawy. Są one podane w sposób charakterystyczny dla prac taksonomicznych publikowanych zwykle w czasopismach takich jak: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* czy książkach typu *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Dodatkowo, w **Części teoretycznej** znajduje się zajmujący jedną stronę rys historyczny na temat fitobakteriologii. W omawianym rozdziale Doktorantka najwięcej miejsca poświęciła na opis struktur ścian komórkowych bakterii



Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, budowie lipopolisacharydów oraz wszelkiego rodzaju metodom stosowanym przy izolowaniu, oczyszczaniu i ich analizie strukturalnej. Kolejny ważny rozdział pracy doktorskiej to **Cel pracy**, w którym zwykle następuje zwięzłe uzasadnienie podjętej tematyki badawczej. Doktorantka zamiast uzasadnienia celowości podjętych badań wylicza wszystkie znane jej lipopolisacharydy o zbadanych polisacharydach O-swoistych izolowane z bakterii *Pseudomonas*, *Pectobacter* oraz *Franconibacter*. W związku z powyższym nasuwa się wrażenie, że głównym celem doktoratu jest powiększenie polisacharydowej (cukrowej) bazy danych o kolejne trzy struktury O-PSów. Zwykle też w tym rozdziale doktoranci dzielą główny temat badawczy na zadania szczegółowe. Pani Sylwia Szulta wyodrębniła ich sześć. Rozdział IV pracy doktorskiej Pani mgr Sylwii Szulty zatytułowany **Część doświadczalna**, to wyliczenie i szczegółowy opis materiałów i metod (przede wszystkim metod) wykorzystywanych przez Doktorantkę w trakcie realizacji postawionych Jej zadań. Zwykle ta część pracy doktorskiej o charakterze doświadczalnym jak również odpowiadające jej części w oryginalnych pracach naukowych są zatytułowane po prostu „**Materiały i Metody**”. Sugerując się tytułem należałoby się spodziewać w powyższym rozdziale opisu przeprowadzonych analiz i wyników tych analiz. W rzeczywistości te zagadnienia znajdujemy w kolejnym rozdziale opatrzonym tytułem **Wyniki i dyskusja**. Jest on bogato ilustrowany chromatogramami, widmami mas i widmami NMR oraz uzupełniony tabelami. Ten obszerny rozdział (liczący 55 stron) składa się z trzech podrozdziałów poświęconych kolejnym badanyom strukturom polisacharydów O-swoistych izolowanym z lipopolisacharydów: *Franconibacter helveticus* 1975, *Pseudomonas donghuensis* P482 oraz *Pectobacter brasiliense* 5527. Każdy z podrozdziałów zbudowany jest w identyczny sposób. Najpierw opisano proces izolacji lipopolisacharydu z komórek bakteryjnych, następnie jego oczyszczanie i hydrolityczne oddzielenie lipidu A od części polisacharydowej. Kolejny etap to wyodrębnienie wysokocząsteczkowej frakcji polisacharydu O-swoistego i jej charakterystyka chemiczna (w tym: identyfikacja monocukrów, analiza metylacyjna, określenie konfiguracji absolutnej). Przedstawiony szereg analiz chemicznych kończy prezentacja i opracowanie widm 1D i 2D NMR. Widma magnetycznego rezonansu jądrowego preparatów OPS służą Doktorantce do potwierdzenia wyników badań chemicznych i ostatecznego ustalenia struktur powtarzających się podjednostek w polisacharydach wraz z ustaleniem konfiguracji anomerycznych atomów węgla w poszczególnych monocukrach budujących podjednostki. Każdy z wyżej wspomnianych podrozdziałów opatrzony jest na końcu krótką notką, w której Doktorantka porównuje swoje wyniki z badaniami innych autorów opublikowanymi i opisującymi antygeny O-swoiste dla bakterii z danego rodzaju. **Podsumowanie** to skondensowana forma rozdziału **Wyniki i dyskusja**. Kolejne dwa rozdziały to wspomniane wcześniej **Streszczenia** (wersja polska i angielska). Rozprawę kończy, zawierający 154 pozycje, spis **Literatury**. Zawiera on

głównie pozycje literaturowe wydane w ciągu ostatnich 20 lat, ale Doktorantka nie stroni od cytowania artykułów o wartości historycznej (np. poz. [9] Burrill, 1881) czy podręczników (np. poz. [1] Kunicki-Goldfinger W., Życie bakterii, PWN, 1998, czy poz. [123] Witkiewicz Z., Podstawy chromatografii WNT, 1992)

### **Merytoryczna analiza rozprawy**

Badania środowiska glebowego, a szczególnie badania mikroorganizmów zasiedlających glebę i tworzących liczne i bardzo zróżnicowane konsorcja w obrębie ryzosfery są obecnie prowadzone na szeroką skalę. Zasadniczy postęp w metodach sekwencjonowania (metody NGS) umożliwia kompleksowe poznanie mikrobiomów (np. endofitów, ektofitów) roślin, śledzenie dynamiki ich zmian w reakcji na zmieniające się warunki zewnętrzne. Badane są wzajemne oddziaływania między mikroorganizmami (w tym między bakteriami, między bakteriami a grzybami) w roślinach i poza nimi, a także oddziaływania między roślinami-gospodarzami a mikroorganizmami. Poznanie wszelkich interakcji tego typu pozwala mieć nadzieję na szerokie wykorzystanie mikroorganizmów w rozwoju zrównoważonego rolnictwa i ochronie środowiska naturalnego. Interakcje w świecie ożywionym wymagają bezpośredniego kontaktu pomiędzy partnerami. Za interakcje w mikroświecie odpowiadają związki będące składnikami (elementami budulcowymi) ścian komórkowych. Do takich należą lipopolisacharydy tworzące u większości bakterii Gram-ujemnych zewnętrzną warstwę membrany zewnętrznej. Ze względu na swoje usytuowanie te glikolipidy mają bezpośredni kontakt ze środowiskiem.

Doktorantka przybliżając obiekt badań opisuje historię mylnego przyporządkowania bakterii obecnie sklasyfikowanych jako *Franconibacter helveticus* do rodzaju *Cronobacter*, tj. do bakterii wywołujących groźne choroby u niemowląt i ludzi starszych. Jak się okazało w trakcie szczegółowych analiz taksonomicznych oba rodzaje mają zbliżony metabolizm i często spotyka się je w podobnych lub tych samych ekosystemach. Jednocześnie nie ma żadnych dowodów świadczących o patogenności szczepów *Franconibacter*. Co więcej pojawiły się doniesienia, że endofity *Frankonibacter* izolowane z brodawek korzeniowych fasoli limeńskiej (odmiana fasoli występująca w Ameryce Południowej) wykazują cechy typowe dla bakterii promujących wzrost roślin uprawnych. Według Doktorantki badanie struktur powierzchniowych jakimi są polisacharydy O-swoiste bakterii z rodzaju *Franconibacter* jest zasadne, gdyż może przyczynić się do opracowania prostych i szybkich testów immunologicznych różnicujących *Franconibacter* i *Cronobacter*, co z kolei będzie przydatne w szczególności przy produkcji sproszkowanych mieszanek dla niemowląt, a jednocześnie pozwoli na wgląd w molekularne procesy interakcji tych bakterii z roślinami. W kolejnych częściach doktoratu został bardzo szczegółowo opisany proces izolacji i oczyszczania

frakcji polisacharydowych pozyskanych z *Franconibacter helveticus* 1975, uwalniania z nich monocukrów, ich identyfikacji i określania konfiguracji absolutnej. Do analizy połączeń między monocukrami Pani Sylwia Szulta wykorzystała metodę znakowania wolnych grup hydroksyloowych polisacharydów poprzez ich metylację. Techniki jednowymiarowego i dwuwymiarowego rezonansu magnetycznego, za pomocą których otrzymano zestaw widm, pozwoliły potwierdzić wyniki analiz chemicznych i ostatecznie ustalić skład i sekwencję cukrów w powtarzającej się czterocukrowej podjednostce.

Identyczny schemat postępowanie zapewnił sukces przy określeniu struktur: trójocukrowej powtarzającej się podjednostki O-PS *Pseudomonas donghuensis* P482 (bakterii zaliczonych do promujących wzrost roślin (PGPRB)) oraz sześciocukrowej powtarzającej się podjednostki O-PS *Pectobacter brasiliense* 5527 (patogen ziemniaka). Pewnym utrudnieniem w przypadku preparatu O-PS P482 było występowanie w nim dość rzadkiego cukru jakim jest ManNAc zaś w przypadku preparatu O-PS 5527 występowanie kwasu mrówkowego amidowo związanego z Quip3N.

Pani mgr Sylwia Szulta wykazuje dużą biegłość w interpretacji wyników zarówno tych otrzymanych metodami chromatografii gazowej jak i chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Obecnie podstawowym instrumentem stosowanym w badaniach biopolimerów w tym oligo- i polisacharydów jest spektrometria magnetycznego rezonansu jądrowego. Jej użycie daje nieosiągalny innymi metodami wgląd w szczegóły strukturalne badanych cząsteczek. Na podstawie lektury przedłożonej pracy doktorskiej dochodzę do wniosku, że tajniki tej techniki nie są Doktorantce obce.

Doktorantka przyjęła zasadę, że każdą potwierdzoną eksperymentalnie strukturę powtarzającej się podjednostki będzie konfrontowała z już pisanymi w literaturze naukowej polisacharydami O-swoistymi syntetyzowanymi przez bakterie pokrewne do badanej, tj. bakterie z tego samego rodzaju. Analizując te fragmenty pracy doktorskiej mogę stwierdzić, że Pani mgr Sylwia Szulta ma duże rozeznanie w literaturze dotyczącej badanego zagadnienia.

Czytając rozdział **Podsumowanie** odniosłem wrażenie, że mam do czynienia z rozbudowanym (uszczegółowionym) streszczeniem całej rozprawy. Zaletą takiego rozdziału jest podanie wszystkich rezultatów w formie bardzo skondensowanej. Brakuje jednak podkreślenia i uwypuklenia tego, co nowego wnoszą zaprezentowane badania (oprócz poznania samych struktur kolejnych polisacharydów O-swoistych) do nauk chemicznych i biologicznych i jak uzyskane wyniki mogą być wykorzystane w przyszłości.

Spis **Literatury** jest konsekwentnie prowadzony według jednego schematu. Pozycje literaturowe zostały ułożone w kolejności cytowania. Nie zauważyłem w spisie literatury zasadniczych błędów. Jednak Doktorantka nie uchroniła się przed użyciem niewłaściwych skrótów

tytułów czasopism, użycia (lub nie) kursywy, mylnej daty ukazania się artykułu, czy błędów literowych. Tego typu błędy są nieliczne w stosunku do liczby cytowanych artykułów. Trzeba zaznaczyć, że takie niedopatrzienia są bardzo trudne do wyeliminowania przy pisaniu tej części pracy doktorskiej.

Czytając i analizując przedłożoną rozprawę nasunęły mi się wnioski i komentarze nad którymi można dyskutować i które mogłyby przyczynić się do poprawy klarowności prezentowanych wyników.

- Jako przedstawiciel dyscypliny „nauki biologiczne” czuję niedosyt informacji dotyczących samych obiektów badań. Prosiłbym o ich uzupełnienie i rozszerzenie. Miedzy innymi nie znalazłem w dostępnej literaturze żadnego opisu szczepu *Franconibacter helveticus* szczep 1975. Doktorantka pozyskując wskazany szczep od prof. S. Forsythe’a jest zapewne w posiadaniu szeregu danych dotyczących miejsca izolacji tych bakterii i ich właściwości biologicznych. Identyczne zapytanie, lub lepiej prośba o zaspokojenie mojej ciekawości, odnosi się do szczepu *Pectobacterium brasilense* 5527. W odróżnieniu od dwóch szczepów wzmiankowanych powyżej Doktorantka podała zaskakująco dużo ciekawych informacji odnośnie trzeciego szczepu - *Pseudomonas donguensis* P482
- Jak wspomina Doktorantka, dwa szczepy (*Pseudomonas donguensis* P482 i *Pectobacterium brasilense* 5527) pochodziły z kolekcji Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed. Czy w takim razie nie warto zaopatrzyć je w numery katalogowe tej kolekcji (IFB)?
- Dużo informacji o heterogenności preparatów lipopolisacharydowych dostarczają rozdziały elektroforetyczne w żelach poliakrylamidowych. Zdjęcia przedstawiające wybarwione żele takich rozdziałów często są zamieszczone w publikacjach opisujących lipopolisacharydy czy polisacharydy O-swoiste. Na przykład, taki rozdział natychmiast uświadomiłby czytelnikowi, że LPS *Pseudomonas donguensis* P482 zawiera głównie frakcje szorstkie, a wysokocząsteczkowy O-PS to znikoma część preparatu LPS.
- Analizując pracę doktorską Pani mgr Sylwii Szulc oraz artykuł zatytułowany „Structural characterization of the O-polysaccharide isolated from *Franconibacter helveticus* LMG23732” opublikowany w 2016 roku w Carbohydrate Research (vol.431, strony 39-41), którego pierwszym autorem jest Doktorantka, doszedłem do wniosku, że O-PS LMG23732 jest identyczny z przedstawionym w doktoracie i izolowanym ze szczepu *F. helveticus* 1975. W pracy doktorskiej nie znalazłem jasnej i jednoznacznej odpowiedzi na pytanie: Czy nazwy

*F. helveticus* LMG23732, *F. helveticus* 1975 dotyczą tego samego szczepu bakterii, czy też szczepy LMG23732 i 1975 wytwarzają ten sam lipopolisacharyd.

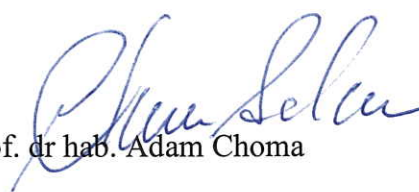
- Intryguje mnie brak określenia konfiguracji absolutnej monocukrów w powtarzających się podjednostkach polisacharydów O-swoistych *Pseudomonas donguensis* P482 i *Pectobacterium brasilense* 5527.
- Obecnie autorzy wielu publikacji opisujących struktury polisacharydów szukając potwierdzenia rezultatów swoich badań analizują dostępne dane genomowe badanych organizmów poszukując genów (operonów) kodujących enzymy odpowiedzialne za biosyntezę danego polimeru cukrowego. Ciekawy jestem czy Pani Sylwia Szulta próbowała tej drogi potwierdzenia swoich osiągnięć?
- Ostatnie pytanie (problem) dotyczy nazewnictwa alditoli: fukitol czy fucitol?, glukitol czy glucitol?

Powyższe zagadnienia proszę traktować jako przyczynek do dyskusji nad już osiągniętymi wynikami jak i nad planami dalszych badań.

### **Wnioski końcowe**

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego jakim jest ustalenie struktur polisacharydów O-swoistych wyizolowanych z lipopolisacharydów trzech gatunków bakterii glebowych. Otrzymane dane wzbogacają wiedzę o różnorodności struktur powierzchniowych mikroorganizmów bytujących w glebie i jako endofity lub patogeny zasiedlające rośliny.

**Podsumowując**, stwierdzam, że cel pracy doktorskiej został osiągnięty. Doktorantka określiła struktury trzech zaplanowanych polisacharydów O-swoistych. Rozprawa doktorska Pani mgr Sylwii Szulty spełnia wymagania stawiane ustawowo i zwyczajowo pracom doktorskim. Przedkładam zatem Wysokiej Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o przyjęcie tej rozprawy i dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o dopuszczenie Pani mgr Sylwii Szulty do publicznej obrony.



Prof. dr hab. Adam Choma