



Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Joanny Banasiewicz,
pt.: „Badania populacyjne bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium* z wykorzystaniem metod
mikrobiologii klasycznej oraz podejść metagenomicznych”

1. Wprowadzenie

Recenzję wykonano na zlecenie Dyrektora Instytutu Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, prof. dr hab. Agnieszki Gniazdowskiej-Piekarskiej.

Rozprawa doktorska mgr Joanny Banasiewicz powstała w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Instytutu Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, pod kierunkiem dr. hab. Tomasza Stępkowskiego, prof. SGGW. Badania będące przedmiotem pracy doktorskiej finansowane były ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu OPUS 8, którego kierownikiem był promotor – dr hab. Tomasz Stępkowski, prof. SGGW oraz ze środków na działalność statutową dla młodych naukowców SGGW, przyznanych Doktorantce.

2. Ocena problematyki badawczej

W ostatnich dziesięciu latach, szybki rozwój metod molekularnych spowodował, że obok wskaźników mikrobiologicznych uzyskiwanych metodami konwencjonalnymi, coraz więcej jest również wskaźników opartych na różnorodności genetycznej. Pozwalają one na bezpośrednią ocenę składu i funkcjonowania społeczności drobnoustrojów na różnych poziomach troficznych. Niemniej jednak należy zaznaczyć, że techniki molekularne są również obarczone pewnym błędem wynikającym z zanieczyszczenia próbki, doboru starterów i technik klasyfikacji taksonomicznej. Ponadto duża pula organizmów glebowych nie została jeszcze scharakteryzowana pod względem taksonomicznym i funkcjonalnym. Dlatego wciąż trwa debata na temat najlepszego wyboru bioindykatorów, które obiektywnie mogą być

wykorzystane do monitorowania jakości gleby, a tym samym do wczesnego ostrzegania o potencjalnej utracie jej wielofunkcyjności. Ważne jest, aby w ocenie jakości siedlisk glebowych stosować podejście holistyczne, uwzględniające różne ekosystemy.

Uwzględniając powyższe dane można stwierdzić, że podjęta przez mgr Joannę Banasiewicz problematyka jest bardzo interesująca i aktualna, a wybór tematu rozprawy doktorskiej, pt.: „Badania populacyjne bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium* z wykorzystaniem metod mikrobiologii klasycznej oraz podejść metagenomicznych” jest uzasadniony zarówno z poznawczego jak i utylitarnego punktu widzenia. Dotyczy bowiem bardzo ważnego zagadnienia, związanego z rozpoznaniem różnorodności bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium*.

3. Ocena formalna

Mgr Joanna Banasiewicz, jako rozprawę doktorską, przedstawiła zbiór 3 opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, poprzedzony streszczeniem w języku polskim i w języku angielskim oraz 47 stronicowym opracowaniem o następującej strukturze: wprowadzenie, cel pracy, wyniki i dyskusja w odniesieniu do poszczególnych publikacji, podsumowanie oraz literatura. Stanowi ono zwięzłe omówienie rezultatów badań zawartych w następujących publikacjach:

1. Stępkowski T., **Banasiewicz J.**, Granada C.E., Andrews M., Passaglia L.M.P. 2018. Phylogeny and phylogeography of rhizobial symbionts nodulating legumes of the tribe Genisteeae. *Genes*, 9(3), 163, doi: 10.3390/genes9030163. (IF = 4.096; 100 pkt MEiN).
2. **Banasiewicz J.**, Granada C.E., Lisboa B.B., Grzesiuk M., Matuszkiewicz W., Bałka M., Schlindwein G., Vargas L.K., Passaglia L.M.P., Stępkowski T. 2021a. Diversity and phylogenetic affinities of *Bradyrhizobium* isolates from Pampa and Atlantic Forest Biomes. *Systematic and Applied Microbiology*. 44(3), 126203, doi: 10.1016/j.syapm.2021.126203. (IF = 4.022; 100 pkt MEiN).
3. **Banasiewicz J.**, Lisboa B.B., da Costa P.B., Schlindwein G., Venter S.N., Steenkamp E.T., Vargas L.K., Passaglia L.M.P., Stępkowski T. 2021b. Culture-independent assessment of the diazotrophic *Bradyrhizobium* communities in the Pampa and Atlantic Forest Biomes localities in southern Brazil. *Systematic and Applied Microbiology*. 126228, doi: 10.1016/j.syapm.2021.126228. (IF = 4.022; 100 pkt MEiN).

Dwie wyżej wymienione publikacje to oryginalne prace twórcze wydane w 2021 roku w *Systematic and Applied Microbiology*, a jedna jest pracą przeglądową, która jest bardzo dobrym uzupełnieniem oryginalnych prac twórczych. Została ona opublikowana w czasopiśmie

Genes. Według bazy Scopus publikacja ta była już 35-krotnie cytowana. Sumaryczny *Impact Factor* zbioru publikacji wynosi 12,14, a suma punktów według MEiN – 300. Są to zatem wskaźniki bardzo dobre i pośrednio dowodzą innowacyjności prowadzonych badań. Wszystkie prace są współautorskie, w dwóch Doktorantka jest pierwszym autorem, a w jednej – drugim.

Mgr Joanna Banasiewicz oświadczyła, że Jej zaangażowanie w powstanie wszystkich publikacji polegało na zebraniu i analizie danych, izolacji bakterii brodawkowych, amplifikacji wybranych markerów filogenetycznych w obrębie uzyskanych szczepów *Bradyrhizobium*, opracowaniu warunków umożliwiających amplifikację genu *nifD* na matrycy DNA izolowanego z gleby, analizach bioinformatycznych i konstrukcji drzew filogenetycznych. W przygotowaniu manuskryptów i ich korekty szacunkowy udział Doktorantki wynosił 40% (Stępkowski i in. 2018), 55% (Banasiewicz i in. 2021a) i 57% (Banasiewicz i in. 2021b). Wszyscy współautorzy wyżej wymienionych publikacji oświadczyli, że wyrażają zgodę na ich wykorzystanie w przewodzie doktorskim.

Konkludując ocenę formalną stwierdzam, że zbiór publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe mgr Joanny Banasiewicz spełnia wymagania stawiane przez obowiązujące prawo osobom ubiegającym się o stopień doktora. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że wyniki badań stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej ukazały się drukiem w renomowanych czasopismach zagranicznych.

4. Ocena merytoryczna

Rozprawa doktorska mgr Joanny Banasiewicz zasługuje na wysoką ocenę merytoryczną. Tytuł ocenianej rozprawy doktorskiej jest precyzyjny i w pełni ujmuje jej treść, a uzyskane wyniki odpowiadają na cel badań. Rozprawę doktorską rozpoczynają streszczenia, w języku polskim i angielskim, które bardzo dobrze dokumentują zakres problematyki badawczej i przedstawiają syntezę uzyskanych wyników.

W pierwszym rozdziale dysertacji zatytułowanym „Wprowadzenie” Doktorantka opisuje bioróżnorodność środowiska glebowego, szczególną uwagę zwracając na zależności biogeograficzne w ewolucji bakterii należących do rodzaju *Bradyrhizobium*. Rozdział ten dobrze wprowadza czytelnika w problematykę badawczą zaprezentowaną w rozprawie. W kolejnej części pracy przedstawiono cel badań, który został sformułowany poprawnie, wyznaczając kierunek badań, natomiast techniki badawcze zostały pominięte, gdyż opisano je obszernie w opublikowanych wcześniej artykułach.

W następnym rozdziale Doktorantka opisała w sposób syntetyczny wyniki badań uzyskane i szczegółowo przedstawione w poszczególnych publikacjach wchodzących w skład rozprawy

doktorskiej. Doskonałą podbudową dla oryginalnych prac twórczych była publikacja przeglądowa wskazująca na bardzo wysoki poziom zróżnicowania mikrosymbiontów zakazających plemię Genisteae.

Przedmiotem badań były bakterie z rodzaju *Bradyrhizobium* pozyskane z ryzosfery roślin z rodziny Fabaceae w południowej Brazylii. Pierwsza oryginalna praca oparta jest na analizie filogenetycznej, a druga na analizie metagenomicznej diazotroficznych populacji izolatów *Bradyrhizobium*. Opis wyników podkreśla spójność publikacji wchodzących w skład rozprawy.

Kolejny rozdział rozprawy stanowi „Podsumowanie” w języku polskim i angielskim, w którym Doktorantka w syntetyczny sposób przedstawiła najważniejsze osiągnięcia uzyskane w swoich badaniach. Na końcu pracy znajduje się spis literatury obejmujący 127 pozycji naukowych. Ostatni rozdział rozprawy stanowią kopie opublikowanych prac wchodzących w skład zbioru publikacji oraz oświadczenia współautorów artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej potwierdzające procentowy udział i indywidualny wkład w powstanie artykułów naukowych.

Konkludując ocenę merytoryczną rozprawy doktorskiej stwierdzam, że publikacje składające się na rozprawę doktorską powstały na podbudowie dobrej koncepcji badań. Przeprowadzone badania są nowatorskie. Wykonano je poprawnie pod względem metodycznym, a wyniki zostały starannie opracowane i dostosowane do wymagań czasopism. Trafne rozwiązania metodyczne czynią uzyskane rezultaty cennymi. Zostały one poprawnie opracowane statystycznie i dobrze zilustrowane. Wnoszą do dyscypliny Nauki Biologiczne nową wiedzę o społeczności bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium*. Doktorantka udowodniła, że posiada ogólną wiedzę teoretyczną do właściwej oceny otrzymanych wyników badań. Nabyła też umiejętność syntetycznego opisu problematyki badawczej zaprezentowanej w zbiorze publikacji, przedstawionych jako rozprawa doktorska.

4.1. Najważniejsze osiągnięcia

Dobrze zaprojektowane badania, oryginalna koncepcja oraz szeroki wachlarz precyzyjnych metod badawczych i odpowiednie przygotowanie Doktorantki umożliwiło osiągnięcie wielu cennych i wartościowych wyników, do których zaliczam:

- 1) wykazanie przynależności prawie 85% uzyskanych izolatów do *Bradyrhizobium elkanii*, a większości pozostałych do *Bradyrhizobium japonicum*;
- 2) wykazanie istotności barier geograficznych w procesie różnicowania się symbiotycznych regionów DNA u *Bradyrhizobium*;

- 3) uzyskanie 876 specyficznych sekwencji genu *nifD* z prawie wszystkich badanych próbek gleby oraz 29 sekwencji tego genu pochodzących z izolatów bakterii otrzymanych metodą pułapek roślinnych;
- 4) odkrycie 18 nowych grup filogenetycznych utworzonych przez diazotroficzne bakterie;
- 5) zaprojektowanie nowych starterów i uzyskanie 34 haplotypów należących do australijskiego kladu I, co stanowi potwierdzenie przypadków biologicznego „zanieczyszczenia” gleb obcymi gatunkami mikroorganizmów;
- 6) zwrócenie uwagi, że zastosowanie masowej technologii sekwencjonowania DNA pozwala na monitorowanie zmian w składzie społeczności bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium* oraz na możliwość horyzontalnego transferu genu *nifD* pomiędzy niektórymi α -proteobakteriami.

Oceniając zbiór 3 opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych stwierdzam, że Pani mgr Joanna Banasiewicz wykazała się dużą wiedzą teoretyczną. Opanowała skomplikowany warsztat badawczy oraz sztukę prezentacji, interpretacji i dyskusji uzyskanych wyników. Publikacje oryginalne stanowią spójną całość. Dlatego też całość sprawia, że zbiór publikacji składających się na rozprawę doktorską wzajemnie się uzupełnia.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska stanowi oryginalne osiągnięcie naukowe i wnosi do literatury przedmiotu wiele istotnych informacji poszerzających stan wiedzy na temat społeczności bakterii należących do rodzaju *Bradyrhizobium*. Ponadto wykazano, że zastosowanie metody metagenomicznej opartej na amplifikacji genu *nifD* wprawdzie potwierdziło wyniki uzyskane metodą tradycyjną, ale dopiero techniki metagenomiczne pozwalają na zaobserwowanie znacznie szerszego spektrum występujących w glebach bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium*. Cenna jest również konstatacja, że wykorzystanie innych niż 16S rRNA markerów genetycznych umożliwia bardziej precyzyjne wyodrębnienie często blisko spokrewnionych, lecz jednak niezależnych linii ewolucyjnych, odkrycie rzadziej reprezentowanych grup, jak również ustalenie pochodzenia geograficznego badanych szczepów.

5. Uwagi krytyczne

Rozprawa doktorska stanowi zbiór 3 artykułów naukowych opublikowanych w dobrych czasopiśmie zagranicznych. Artykuły te zostały ocenione pozytywnie przez recenzentów wydawniczych, dlatego do zbioru publikacji nie mam żadnych uwag. Wydaje mi się jednak, że o ile Doktorantka zbiór publikacji zdecydowała się poprzedzić opracowaniem w języku polskim, to w tym opracowaniu mógłby znaleźć się także rozdział metodyka oraz rozdział

wnioski. Opis metodyki badań mógłby być krótki i ograniczony do badanych czynników, gdyż szczegółowa metodyka jest zamieszczona w artykułach naukowych.

6. Ocena końcowa

Reasumując stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Joanny Banasiewicz, pt.: „Badania populacyjne bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium* z wykorzystaniem metod mikrobiologii klasycznej oraz podejść metagenomicznych” spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2017, poz. 1789 z późn. zm. W zw. z art. 179 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018, poz. 1669).

Zatem wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Instytutu Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie mgr Joanny Banasiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Joanny Banasiewicz stosowną nagrodą. Jako uzasadnienie wyróżnienia przedstawiam następujące argumenty:

- 1) wysoką wartość poznawczą rozprawy doktorskiej,
- 2) aktualność problematyki badawczej,
- 3) opanowanie i umiejętne wykorzystanie nowoczesnych technik badawczych,
- 4) opublikowanie zbioru publikacji w renomowanych międzynarodowych czasopismach naukowych.

Olsztyn, 5.11.2021 r.


prof. dr hab. Jadwiga Wyszowska