

Autoreferat

opis osiągnięć naukowych związanych z postępowaniem habilitacyjnym

dr inż. Urszula Marzena Jankiewicz
Katedra Biochemii
Wydział Rolnictwa i Biologii
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 2016

1. Dane personalne

Imię i nazwisko	Urszula Marzena Jankiewicz
Stopień naukowy	doktor nauk biologicznych
Miejsce pracy	Katedra Biochemii Wydział Rolnictwa i Biologii Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie ul. Nowoursynowska 159 02-776 Warszawa
Aktualnie zajmowane stanowisko	adiunkt

2. Wykształcenie, posiadane dyplomy i stopnie naukowe z podaniem nazwy, daty i miejsca ich uzyskania

07. 06. 2000	doktor nauk biologicznych w zakresie biologii , rozprawa doktorska pt. „Właściwości molekularne aminopeptydaz bakterii glebowych <i>Pseudomonas</i> sp.”, wykonana w Katedrze Biochemii, Wydziału Rolniczego SGGW (obecnie Wydział Rolnictwa i Biologii SGGW) promotor: prof. dr hab. Wiesław Bielawski
1996 - 2000	studia doktoranckie na Wydziale Rolniczym SGGW w zakresie Agrobiologii
15. 05. 1996	magister inżynier rolnictwa w specjalności Biotechnologia Rolnicza; praca magisterska pt. „Rozkład polisacharydów strukturalnych i białek pod wpływem bakterii glebowych <i>Pseudomonas</i> sp”. wykonana pod kierunkiem dr Janiny Droese w Katedrze Biochemii Wydziału Rolniczego SGGW
1990 - 1996	studia magisterskie na Wydziale Rolniczym, SGGW

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01. 07. 2000 – 31. 10. 2002	asystent w Katedrze Biochemii, Wydziału Rolniczego SGGW
01.11.2002 - do obecnie	adiunkt w Katedrze Biochemii, Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW

4. **Wskazanie osiągnięcia naukowego** wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy 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 ze zm.)

a) **Tytuł osiągnięcia naukowego:** jednotematyczny cykl publikacji pod wspólnym tytułem:

„Ryzosferowe bakterie chitynolityczne i ocena ich przydatności do biologicznego zwalczania fitopatogenicznych grzybów pleśniowych”

b) **Wykaz prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:**

Publikacje oryginalne

4.1 Jankiewicz U., Swiontek Brzezinska M. The role of exochitinase type A1 in the fungistatic activity of the rhizosphere bacterium *Paenibacillus* sp. M4. Arch. Biol. Sci., 2016, DOI: 10.2298/ABS150619138J (IF 0,718; 15 pkt; udział 90%).

4.2 Jankiewicz U., Swiontek Brzezinska M. Purification, characteristics and identification of chitinases synthesized by the bacterium *Serratia plymuthica* MP44 antagonistic against phytopathogenic fungi. Appl. Biochem. Microbiol., 2015, 51, (5), 560-565 (IF 0,735; 15pkt; udział 85%).

4.3 Jankiewicz U., Swiontek Brzezinska M. Purification, characterization, and gene cloning of a chitinase from *Stenotrophomonas maltophilia* N4. J. Basic Microbiol. 2015, 55 (6), 709-717 (IF 1,823; 20 pkt; udział 90%).

4.4 Jankiewicz U., Swiontek Brzezinska M., Saks E. Identification and characterization of a chitinase of *Stenotrophomonas maltophilia*, a bacterium that is antagonistic towards fungal phytopathogens. J. Biosci. Bioeng., 2012, 113(1), 30-35 (IF 1,737; 30 pkt; udział 50%; liczba cytowań: 13).

4.5 Swiontek Brzezinska M., Jankiewicz U., Burkowska A. Purification and characterization of *Streptomyces albidoflavus* antifungal components. Appl. Biochem. Microbiol., 2013, 49 (5), 451-457 (IF 0,658; 15 pkt; udział 65%).

oraz publikacja przeglądowa

4.6 Swiontek Brzezinska M., Jankiewicz U., Burkowska A., Walczak M. Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. Curr. Microbiol., 2014, 68, (1), 71-81 (IF 1,359; 20 pkt; udział 40%, liczba cytowań: 11).

sumaryczny *Impact Factor* (IF): **7,03**; suma punktów zgodnie z wykazem MNiSW: **115**

W obliczeniach uwzględniono wartość IF zgodnie z rokiem ukazania się pracy; w przypadku publikacji z roku 2015 lub nr DOI uwzględniono IF za rok 2014,

punkty MNiSW za publikacje liczone zgodnie z rokiem ukazania się publikacji, w przypadku nr DOI –zgodnie z najnowszą, dostępną punktacją za rok 2015.

Liczbę cytowań podano zgodnie z Web of Science (All Databases).

Oświadczenia określające indywidualny wkład współautorów w powstanie poszczególnych publikacji stanowią załącznik 6.

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

WPROWADZENIE ORAZ CEL NAUKOWY

Odejście od tradycyjnego płodozmiaru, jak również stosowanie tzw. oszczędnościowych systemów uprawy najczęściej prowadzi do namnażania na polach uprawnych patogenicznych pleśni. Porażone plantacje roślin uprawnych to nie tylko straty ekonomiczne, lecz także zagrożenie idiolitami, groźnymi dla zdrowia ludzi

i zwierząt. W zbożach i w produktach zbożowych najczęściej wykrywa się skażenia trichotecenami oraz ochratoksynami, toksynami pochodzącymi głównie od grzybów z rodzaju *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* (Chełkowski, 2012; Solarska i Marzec, 2012).

Stosowane obecnie metody ochrony roślin, oparte głównie o chemiczne fungicydy, stwarzają wiele problemów związanych z nabywaniem oporności przez patogeny, skażeniem środowiska oraz szkodliwością dla zdrowia człowieka (Baraldi i in., 2003; Choudhury i in., 2011). Obecnie, jednym z głównych wyzwań rolnictwa jest zaproponowanie skutecznych alternatywnych lub wspomagających metod w stosunku do chemicznych środków ochrony roślin. W związku z tym, dużą uwagę skupiono na zastosowaniu biologicznych metod w celu eliminacji roślinnych chorób grzybowych (Qin i in., 2015).

Biologiczna kontrola czyli biokontrola, według najprostszej definicji to proces redukcji niepożądanych efektów wywołanych przez jeden organizm dzięki działalności innego organizmu, który nie jest rośliną – gospodarzem, szkodnikiem, patogenem lub człowiekiem (Cook i Baker, 1983). Są to więc biopreparaty zawierające czynnik (lub czynniki) pochodzenia biotycznego (BCA - biological control agents), stosowane w celu eliminacji organizmów patogenicznych dzięki wykorzystaniu oddziaływań bezpośrednich albo pośrednich. Wśród biotycznych czynników biokontroli, do których zaliczyć można wirusy, bakterie i grzyby, kluczowe znaczenie dla ochrony roślin mają niepatogeniczne bakterie związane z ryzosferą roślin, tzw. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). Do tej grupy zaliczamy bakterie m.in. z rodzajów: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Clostridium*, a także wykorzystywane w moich badaniach *Stenotrophomonas*, *Serratia*, *Streptomyces* oraz *Paenibacillus*. Są to mikroorganizmy, które kolonizując strefę korzeni roślin mogą działać jako biopestycydy i/lub bionawozy i przyczyniają się w ten sposób do zwiększenia wydajności upraw. Wydzielane przez te drobnoustroje glebowe metabolity takie jak antybiotyki, siderofory, kwas salicylowy, cyjanowodór czy enzymy lityczne (chitynazy, β -1,3 glukanazy, proteazy oraz celulazy), mogą w bezpośredni sposób wpływać na mikroorganizmy patogeniczne, hamując ich wzrost i rozwój (Vessey, 2003; Okorski i in., 2014, Grobelak i in., 2015).

Bakteryjne zewnątrzkomórkowe chitynazy [EC.3.2.1.14 i EC.3.2.1.52], stanowiące obiekt moich badań, są szczególnie skutecznym narzędziem w walce z grzybowymi patogenami, ponieważ przez hydrolityczny rozkład wiązań β -1,4

glikozydowych, prowadzą do degradacji chityny obecnej w strzępkach grzybni fitopagenicznych pleśni. Zawartość tego polisacharydu w ścianach komórkowych niektórych grzybów pleśniowych może wynosić nawet do 60% suchej masy (Ruiz-Herrera 1991; Schoffemeer i in., 1999; Bowmani i Free, 2006). Zdolność do syntezy chitynaz stwierdzono m. in. u bakterii z rodzaju: *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Legionella*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces* i *Vibrio* (CAZy database). Wydzielane chitynazy umożliwiają wykorzystanie chityny, jako źródła węgla i azotu, a także przyczyniają się do obiegu pierwiastków w przyrodzie. Pod względem aplikacyjnym enzymy te znalazły zastosowanie w przemyśle i medycynie. Warto tu wspomnieć o produkcji protoplastów grzybowych i chitooligosacharydów (Yano i in., 2008; Patil i in., 2000). Ważnym kierunkiem badań są prace nad potencjalną możliwością wykorzystania chitynaz w biopreparatach do ochrony roślin, jako składnika powodującego lizę chitynowych ścian komórkowych grzybów lub pancerzyków owadzych szkodników roślin (Gohel i in., 2006; Bhattacharya i in., 2007).

W świetle powyższych danych literaturowych niezwykle interesujące wydało mi się podjęcie badań nad występowaniem bakterii chitynolitycznych w ryzosferze zbóż uprawianych w Polsce. Badania ukierunkowałam na zbadanie właściwości syntetyzowanych przez nie chitynaz i ocenę biologicznej przydatności tych enzymów do biologicznej ochrony roślin. Nawiązanie współpracy naukowej z Zakładem Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UMK w Toruniu pozwoliło na połączenie warsztatu biochemicznego i mikrobiologicznego, co znacznie rozszerzyło możliwości poznawcze prowadzonych badań. Co więcej, podjęta tematyka zyskała uznanie w środowisku naukowym, o czym świadczą przyznane finansowania projektów naukowych (zał.3, pkt V, poz. 1-2). Wyniki wieloletnich badań nad chitynazami bakterii ryzosferowych i ich potencjalnym zastosowaniem do hamowania wzrostu grzybów pleśniowych opublikowaliśmy w ośmiu publikacjach naukowych (poz. 4.1-4.5 osiągnięcia naukowego; zał. 3, pkt IIa, poz. 6-8) oraz w formie pięciu doniesień konferencyjnych (zał.3, pkt VIIIb, poz. 1 oraz poz. 11-14). Do utworzenia monotematycznego cyklu publikacji, stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe wybrałam pięć publikacji zawierających najbardziej interesujące i wartościowe wyniki. Do nich dołączyłam szóstą publikację (poz. 4.6 osiągnięcia naukowego), będącą przeglądem literatury, w której przedstawiłam i krytycznie oceniłam swoje osiągnięcia naukowe na tle literatury światowej.

Celem badań, składających się na osiągnięcie naukowe, było poszukiwanie w środowisku ryzosferowym bakterii wytwarzających chitynazy, zbadanie właściwości tych enzymów oraz na tej podstawie ocena ich przydatności do hamowania wzrostu fitopatogenicznych grzybów pleśniowych.

Rozwiązanie tak postawionego celu badawczego realizowałam przez:

- izolację, selekcję i identyfikację gatunkową bakterii chitynolitycznych zasiedlających ryzosferę zbóż
- optymalizację warunków wytwarzania chitynaz przez wybrane szczepy bakterii
- oczyszczanie i analizę proteomiczną chitynaz
- zbadanie właściwości chitynaz
- testowanie aktywności fungistatycznej bakterii i ich chitynaz

OMÓWIENIE I PODSUMOWANIE OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW

Izolacja, selekcja i identyfikacja gatunkowa bakterii chitynolitycznych zasiedlających ryzosferę zbóż

Do badań wybrałam bakterie chitynolityczne, zasiedlające ryzosferę roślin zbożowych z uwagi na duży areal uprawy tych roślin i ich znaczenie gospodarcze. Próby gleby ryzosferowej wraz z korzeniami roślin będących w stadium strzelania w źdźbło, pobrałam z upraw rolnych pszenicy ozimej odmiany Bogatka oraz jęczmienia jarego odmiany Soldo.

Izolację bakterii ryzosferowych przeprowadzono zgodnie z metodyką opisaną przez Buyer (1995). Kolejne rozcieńczenia roztworu glebowego były wysiewane na podłoże agarowe z dodatkiem chityny koloidalnej. W dalszych doświadczeniach wykorzystałam te izolaty, które wokół swoich kolonii tworzyły największe strefy przejaśnień na podłożu chitynowym, świadczące o dużej aktywności chitynolitycznej. Identyfikację gatunkową bakterii przeprowadziłam metodami klasycznymi w oparciu o obserwacje mikroskopowe oraz cechy biochemiczne z użyciem testów API (BioMérieux). Identyfikację gatunkową bakterii przeprowadzoną wyżej wymienionymi metodami dodatkowo potwierdziłam metodami molekularnymi przez analizę sekwencji DNA kodujących 16S rRNA. Amplifikację tych genów prowadziłam techniką PCR z wykorzystaniem starterów uniwersalnych (27F-1492R lub 1401R) oraz genomowego DNA wyizolowanego z komórek badanych izolatów bakteryjnych. Do porównania

uzyskanych sekwencji nukleotydowych, z dostępnymi w bazach NCBI danymi, zastosowano program BLAST. Sekwencje genów kodujących 16S rRNA bakterii wykorzystanych w badaniach (z wyjątkiem *Streptomyces albidoflavus*) zostały zarejestrowane w bazie danych: Genbank/EMBL/DDBJ z następującymi numerami dostępu:

LC043402 - *Paenibacillus* sp. M4 (poz. 4.1 osiągnięcia naukowego)

LC003619 - *Serratia plymuthica* MP44 (poz. 4.2 osiągnięcia naukowego)

AB667906 - *Stenotrophomonas maltophilia* N4 (poz. 4.3 osiągnięcia naukowego)

AB661774 - *Stenotrophomonas maltophilia* MUJ (poz. 4.4 osiągnięcia naukowego)

Sekwencja niezarejestrowana - *Streptomyces albidoflavus* (poz. 4.5 osiągnięcia naukowego).

Optymalizacja warunków wytwarzania chitynaz bakteryjnych

Niezbędnym etapem badań była optymalizacja składu podłoża hodowlanego przeprowadzona indywidualnie dla każdego szczepu bakterii. Wyniki, które uzyskałam potwierdziły wcześniejsze doniesienia, że bakteryjne chitynazy są enzymami podlegającymi indukcji, a rolę induktora pełni chityna i produkty jej degradacji, podobnie jak w doświadczeniach m.in. Sahai i Manocha (1993) oraz Felse i Panda (1999). Natomiast u bakterii *Pseudoalteromonas piscicida* wykazano obecność dwuskładnikowego systemu regulacji złożonego z kinazy histydynowej oraz regulatora odpowiedzi. Pod wpływem sygnałów środowiskowych, np. obecności chityny w środowisku reszta histydyny w sekwencji kinazy ulega autofosforylacji i katalizuje fosforylację reszty asparaginy w cząsteczce regulatora odpowiedzi. Regulator po ufosforylowaniu łączy się z sekwencją promotora, co aktywuje transkrypcję genów kodujących chitynazy (Miyamoto i in., 2007). Indukcja i represja syntezy chitynaz bakteryjnych może więc zachodzić pod wpływem obecności odpowiednich składników w podłożu hodowlanym bakterii. Uważa się, że w środowisku naturalnym synteza chitynaz może być również indukowana pod wpływem kontaktu z chitynowymi ścianami komórkowymi grzybów (poz. 4.6 osiągnięcia naukowego). Nasze obecnie prowadzone badania potwierdziły, że obecność ścian komórkowych grzybów pleśniowych powoduje wzrost poziomu aktywności uwalnianych chitynaz (dane nieopublikowane).

Brak lub jedynie śladową aktywność enzymatyczną obserwowano w hodowlach bakterii na pożywkach pozbawionych chityny. W przypadku bakterii *Streptomyces albidoflavus* (poz. 4.5 osiągnięcia naukowego) najlepszym induktorem okazała się 2% chityna. U pozostałych szczepów bakterii (poz. 4.1-4.4 osiągnięcia naukowego) wysoką aktywność chitynaz obserwowałam w obecności 1% chityny w składzie podłoża hodowlanego. Bakterie *Stenotrophomonas maltophilia* N4 wykazywały także znaczną aktywność chitynolityczną po wzbogaceniu podłoża mineralnego w chitosan, produkt deacylacji chityny (poz. 4.3 osiągnięcia naukowego). Regulacja aktywności chitynaz, wydzielanych do podłoża hodowlanego, może także podlegać represji katabolicznej w obecności glukozy (Ahmadian i in., 2007) co udowodniono doświadczalnie w przypadku *Paenibacillus* sp. M4 (poz. 4.1 osiągnięcia naukowego).

Oczyszczanie i analiza proteomiczna chitynaz

Scharakteryzowanie badanych enzymów i zbadanie ich aktywności fungistatycznych było możliwe po ich wyizolowaniu z hodowli bakteryjnych i dokładnym oczyszczeniu z innych białek bakterii. Dlatego tak dobrałam techniki chromatograficzne, aby umożliwiły one wydajną izolację aktywnych chitynaz z płynów pohodowlanych poszczególnych szczepów bakterii. Etapem poprzedzającym rozdziały chromatograficzne było wytrącanie białek siarczanem amonu lub acetonem. Prostem i skutecznym rozwiązaniem okazało się zastosowanie cieczonej chromatografii adsorpcyjnej z wykorzystaniem chityny koloidalnej jako adsorbenta (poz. 4.4-4.5 osiągnięcia naukowego). Relatywnie duży stopień oczyszczenia chitynaz uzyskano także po zastosowaniu chromatografii jonowymiennej, hydrofobowej oraz sączenia molekularnego (poz. 4.1-4.2 osiągnięcia naukowego).

Sekwencje peptydów, uzyskanych po zastosowaniu spektrometrii mas, umożliwiły ich porównanie z opublikowanymi danymi i identyfikację proteomiczną potencjalnie fungistatycznych chitynaz. Po przeprowadzeniu analizy bioinformatycznej stwierdziłam, że zgodnie z bazą Merops (<https://merops.sanger.ac.uk>), badane chitynazy należą do rodziny 18 hydrolaz glikozydowych (pozycje 4.1 - 4.2, 4.4 - 4.5 osiągnięcia naukowego). W rodzinie tej przeważają enzymy bakteryjne, choć zaliczono do niej chitynazy wirusowe, archaea, grzybów, roślin, a także bezkręgowców i kręgowców. Niezwykle interesujące jest wykrycie konserwowanego motywu aminokwasowego DXDXE w sekwencji chitynazy *Streptomyces albidoflavus* (poz. 4.5 osiągnięcia

naukowego), typowego dla rodziny 18 hydrolaz glikozydowych, mimo że zdecydowana większość chitynaz bakterii *Streptomyces* zaliczona jest do rodziny 19 (Cantarel i in., 2009; Vuong i Wilson, 2010). Podstawą podziału hydrolaz glikozydowych na rodziny jest podobieństwo sekwencji aminokwasowych i bezpośrednio z tym powiązanej struktury domen katalitycznych (Henrissat, 1991). Na tej podstawie wyróżniono dotychczas 131 rodzin hydrolaz glikozydowych (GH), w tym trzy rodziny (18, 19 i 20), skupiające enzymy chitynolityczne. Rodzina 20 skupia β -N-acetyloglukozaminidazy i chitobiazę pochodzące z różnych źródeł (www.cazy.org). Pomiedzy tymi rodzinami zaobserwowano różnice w mechanizmie katalizy. W przypadku hydrolaz glikozydowych (GH) z rodziny 18 i 20 stereochemiczny przebieg reakcji zachodzi z retencją konfiguracji w przeciwieństwie do rodziny 19, gdzie zaobserwowano inwersję konfiguracji anomerycznej (Brameld i Goddard, 1998; van Aalten in. 2001).

Geny kodujące chitynazy są zlokalizowane na chromosomie bakteryjnym. W genomie bakterii może znajdować się tylko jeden gen, jak np. u *S. maltophilia* 34S1 (Crossman i in., 2008) lub kilka, jak u *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Bentley i in., 2002). Bakteryjny system chitynolityczny, złożony z kilku białek enzymatycznych, może także powstawać w wyniku modyfikacji potranslacyjnych, tak jak to opisano u *Bacillus subtilis* WL-12 (Alam i in., 1996).

W przypadku bakterii *S. maltophilia* N4 otrzymałam gen o długości 2106 par zasad kodujący chitynazę Sm4 (poz.4.3 osiągnięcia naukowego). Uzyskaną sekwencję nukleotydową DNA umieściłam w bazie danych GenBank/EMBL/DDBJ z numerem dostępu AB973459. Wydedukowana, na podstawie sekwencji nukleotydowej, sekwencja aminokwasowa wykazywała 99% podobieństwo do sekwencji chitynazy *S. maltophilia* 5BA-I-2 (GenBank: EVT71138). W obrębie sekwencji aminokwasowej chitynazy Sm4 zidentyfikowano, z wykorzystaniem programu Blast, następujące domeny funkcjonalne: domenę wiążącą chitynę (ChiA1_BD) w rejonie pomiędzy 52–92 aminokwasem, domenę kadheryny (CARDB) pomiędzy 108–182 aminokwasem, domenę fibronektyny pomiędzy 204 a 291 aminokwasem, oraz najważniejszy obszar - domenę katalityczną rodziny 18 hydrolaz glikozydowych (CatD GH18_chitinase) w rejonie sekwencji-303–688 aminokwasów. Opisane dotychczas chitynazy są zróżnicowana zarówno pod względem ilości, rodzaju, jak i ułożenia domen. W strukturze wszystkich chitynaz występuje, co najmniej jedna domena białkowa - katalityczna (CatD), niezbędna do hydrolizy wiązań β -1,4 glikozydowych. Każda z trzech rodzin GH enzymów chitynolitycznych zawiera w obrębie domeny

katalitycznej charakterystyczne konserwowane motywy aminokwasowe. Poza tym, u wielu chitynaz podobnie jak u Sm4 występuje domena wiążąca chitynę (ChBD), która ma istotne znaczenie w procesie wiązania enzymu z cząsteczką nierozpuszczalnego substratu. Wiązanie z substratem następuje z udziałem konserwowanych reszt aminokwasów aromatycznych wyeksponowanych na powierzchni ChBD (Morimoto i in., 1997; Hashimoto i in., 2000). Domeny fibronektyny i kadheryny, obecne również w sekwencji sklonowanej chitynazy, prawdopodobnie wspomagają proces katalizy (Frederiksen i in., 2013).

Badanie właściwości chitynaz

Chitynazy bakteryjne różnią się pomiędzy sobą pod względem mas cząsteczkowych, optymalnych warunków działania, termostabilności, specyficzności substratowej, reakcji na jony metali i inne reagenty (Bhattacharya i in., 2007, Saks i Jankiewicz; 2010, poz. 4.6 osiągnięcia naukowego).

Masa cząsteczkowa chitynazy *S. albidoflavus* wynosi ok. 50 kDa, a chitynazy *S. maltophilia* ok. 52 kDa. Są to białka o budowie monomerycznej, a wyznaczone masy cząsteczkowe (techniką SDS –PAGE) chitynaz badanych bakterii mieszczą się w przedziale 20 - 70 kDa, charakterystycznym dla zbadanych dotychczas chitynaz (Bhattacharya i in., 2007).

Większość chitynaz bakteryjnych wykazuje optimum aktywności pomiędzy pH 5 a 8 oraz 40 -60 °C (tabela 1, poz. 4.6 osiągnięcia naukowego), ale wartości te zależą od gatunku bakterii i miejsca ich występowania. W przypadku charakteryzowanych chitynaz najwyższą aktywność obserwowano w odczynie lekko kwaśnym, w pH między 5,4 a 6,8, a optimum temperaturowe tych enzymów wahało się pomiędzy 40 a 50°C (poz. 4.1-4.4 osiągnięcia naukowego). Charakterystyczny dla chitynazy *Paenibacillus* oraz *Stenotrophomonas* był szeroki zakres pH (~5 - 8) w którym były one aktywne.

Chitynazy obu szczepów *S. maltophilia* wykazywały 100% stabilność termiczną w czasie dwugodzinnej inkubacji w 40°C (poz. 4.3-4.4 osiągnięcia naukowego). Podobne wyniki uzyskano dla chitynazy *Streptomyces albidoflavus* oraz *Paenibacillus* sp (poz. 4.1 i 4.5 osiągnięcia naukowego). Jednak, już w wyższej o 10°C temperaturze enzymy te w znacznym stopniu traciły aktywność. Bardziej termostabilna okazała się jedynie endochitynaza oczyszczona z hodowli *S. plymuthica* (pozycja 4.2 osiągnięcia naukowego).

Ze względu na położenie hydrolizowanego wiązania, enzymy chitynolityczne dzieli się na endochitynazy, katalizujące hydrolizę losowo położonych wiązań glikozydowych wewnątrz łańcucha i w ten sposób uwalniające chitooligosacharydy, egzochitynazy - katalizujące uwalnianie dwucukru, chitobiozy od redukującego lub nieredukującego końca łańcucha chityny oraz β -N-acetyloglukozaminidazy, katalizujące uwalnianie monomerów β -N-acetylo-D-glukozaminy (Gokul i in., 2000).

Zastosowane w doświadczeniach syntetyczne substraty chromogenne lub fluorogenne pozwoliły na określenie specyficzności oczyszczonych enzymów w stosunku do położenia w cząsteczce substratu rozkładanego wiązania β -1,4 - glikozydowego. Wykazałam, że *S. albidoflavus*, podobnie jak obydwie szczepy bakterii *S. maltophilia*, wydziela endochitynazę (poz. 4.3, 4.4 - 4.5 osiągnięcia naukowego). W przypadku chitynazy bakterii N4 wyznaczyłam także stałe powinowactwa (K_m , stała Michaelisa) z zastosowaniem zarówno substratów naturalnych jak i nitrofenylowych pochodnych glukozoaminy. Na podstawie wartości K_m potwierdziłam, że jest to endochitynaza o dużym powinowactwie do chityny koloidalnej jako substratu.

Natomiast z hodowli bakterii *Paenibacillus* sp. M4 i *S. plymuthica* MP44 wyizolowałam zarówno endochitynazy jak egzochitynazy (poz. 4.1-4.2 osiągnięcia naukowego).

Często obserwuje się u chitynaz bakteryjnych wzrost aktywności w obecności dwuwartościowych jonów wapnia i magnezu. Ponadto aktywatorami tych enzymów mogą być jony Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Na^+ , K^+ jak również detergenty niejonowe-takie jak Tween 20, Tween 80, Triton X-100. Inhibicję aktywności chitynaz mogą wywołać Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , EDTA, SDS oraz mocznik. Co ciekawe, jony Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} oraz Ca^{2+} mogą podwyższać lub hamować aktywność chitynaz syntetyzowanych przez różne bakterie (tabela nr 1, poz. 4.6 osiągnięcia naukowego).

W naszych badaniach zaobserwowaliśmy jedynie niewielki wzrost aktywności chitynaz syntetyzowanych przez *Stenotrophomonas* oraz *Streptomyces* (poz. 4.3-4.5 osiągnięcia naukowego) pod wpływem jonów wapnia i magnezu, dlatego uznaliśmy je za stabilizatory aktywności chitynolitycznej. Natomiast silny efekt inhibitorowy zaobserwowaliśmy w obecności Mn^{2+} i Hg^{2+} (poz.4.5), Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} (poz. 4.4) lub Hg^{2+} i NH_4^+ (poz.4.3 osiągnięcia naukowego). Surfaktant anionowy, SDS wywierał niekorzystny, wpływ na aktywność chitynaz *S. albidoflavus* i *S. maltophilia* N4. Surfaktanty, takie jak Tween -20, Tween-80 oraz Triton X-100 miały niewielki stymulujący wpływ na aktywność badanej chitynaz, co mogło być spowodowane

łatwiejszym dostępem enzymu do substratu w warunkach reakcji. Co ciekawe, w przypadku chitynazy bakterii N4 (poz. 4.3 osiągnięcia naukowego), obecność związków redukujących, takich jak cysteina i 2 – merkaptoetanol powodowała wzrost aktywności, co sugeruje zaangażowanie reszt cysteiny w mechanizm katalizy u tego enzymu. Warto też podkreślić, że związek chelatujący jony metali (EDTA) nie hamował, a wręcz aktywował w niewielkim stopniu tę chitynazę. Takie zjawisko opisano u niektórych proteaz cysteinowych, np. papainy (Arnon, 1970).

Aktywność fungistatyczna bakterii oraz ich chitynaz względem fitopatogenicznych grzybów pleśniowych

Grzyby pleśniowe to ważny element funkcjonowania ekosystemów glebowych. Biorą udział w rozkładzie związków organicznych, przemianie związków mineralnych oraz w syntezie wielu związków bioaktywnych (Sterflinger, 2000). Jednak wiele z nich powoduje choroby roślin. Do szczególnie uciążliwych patogenów roślin uprawnych w naszych warunkach klimatycznych należą grzyby z rodzaju *Fusarium*, *Aspergillus* i *Penicillium*. Zwalczanie tych patogenów prowadzi się zwykle metodami chemicznymi, choć w ostatnich latach obserwuje się duże zainteresowanie metodami biologicznymi. Obiecujące wyniki badań nad zastosowaniem enzymów mykologicznych, w tym chitynaz do biologicznej ochrony roślin uzyskano m.in. dla bakterii z rodzaju *Bacillus* (Slimene i in. 2015) oraz *Streptomyces* (Singh i Chhatpar, 2011).

W moich badaniach, zasadniczym kryterium wyboru bakterii chitynolitycznych do dalszych doświadczeń była ich zdolność hamowania wzrostu wybranych gatunków grzybów patogenicznych. W badaniach wykorzystano grzyby pleśniowe z rodzaju *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizoctonia*, *Cladosporium*, *Chaetomium* oraz *Botrytis*, pozyskane z Banku Patogenów Instytutu Ochrony Roślin w Poznaniu lub Zakładu Fitopatologii Wydziału Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu SGGW. Bakteria *Serratia plymuthica* MP44 okazała się bardzo skutecznym antagonistą względem grzybów pleśniowych, ponieważ ograniczała w ponad 60% wzrost grzybni *Rhizoctonia solani*, *Cladosporium* sp oraz *Alternaria alternata* (poz. 4.2 osiągnięcia naukowego). Drugi z silnych antagonistów bakteryjnych, *Paenibacillus* sp M4 w dużym stopniu hamował wzrost *F. oxysporum* i *solani* jak również *A. alternata* (poz. 4.1 osiągnięcia naukowego).

Przeprowadziłam także ocenę skuteczności chitynaz w hamowaniu wzrostu wybranych gatunków grzybów patogennych. W badaniach tych wykorzystano preparaty enzymatyczne nieoczyszczonych chitynaz (wytrąconych i dializowanych białek płynu pochodowlanego) oraz oczyszczonych technikami chromatograficznymi. Szczególnie obiecujące wyniki uzyskano dla endochitynaz *S. maltophilia* MUJ oraz *S. albidoflavus*. W przypadku chitynazy bakterii *S. maltophilia* MUJ (pozycja 4.4 osiągnięcia naukowego) zaobserwowano aktywność grzybobójczą w stosunku do *Fusarium solani*, *F. oxysporum* oraz *Rhizoctonia solani*. Endochitynaza *S. albidoflavus* (pozycja 4.5 osiągnięcia naukowego) wykazywała aktywność fungistatyczną w stosunku do *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *A. alternata* oraz *Botrytis cinerea*. Aktywność grzybobójczą w stosunku do *A. alternata* i *F. oxysporum* wykryto także u egzochitynazy bakterii M4 (poz. 4.1 osiągnięcia naukowego). Ciekawych obserwacji dostarczyły doświadczenia z zastosowaniem bakterii *S. plymuthica*, gdzie z płynu pochodowlanego tych bakterii wyizolowano zarówno egzochitynazę jak i endochitynazę. Jednak zahamowanie wzrostu grzybnii *F. culmorum* i *Ch. globosum* zaobserwowano jedynie po zastosowaniu endochitynazy (poz. 4.2 osiągnięcia naukowego).

Reasumując, aktywność fungistatyczna badanych bakterii chitynolitycznych była zdecydowanie wyższa niż aktywnych preparatów enzymatycznych. Jedną z przyczyn takiego zjawiska, mogło być to, że w warunkach doświadczalnych nie osiągnięto optymalnych warunków dla działania i stabilności badanych chitynaz. Poza tym, w hodowlach dwuorganizmowych bakterie mogły uwalniać chitynazy w sposób ciągły, co powodowałoby wyższą skuteczność lizy ścian komórkowych pleśni. Zauważono również, że enzymatyczne preparaty nieoczyszczone miały większą skuteczność w hamowaniu wzrostu grzybnii fitopatogenów niż preparaty oczyszczone, co spowodowane było ewentualnym występowaniem w nich dodatkowych form chitynaz lub innych enzymów litycznych. Większa efektywność fungistatyczna wynika z synergistycznego oddziaływania mykolitycznych enzymów na strzępki grzybnii patogena (Chang i in., 2003). Nie bez znaczenia mogą być także różnice w zawartości chityny w ścianach komórkowych testowanych grzybów.

Aktywność fungistatyczną wykrywano głównie u endochitynaz, poza jedną egzochitynazą typu A1 syntetyzowaną przez *Paenibacillus* sp. M4. Wydaje się to być powiązane z swoistością tych enzymów względem położenia rozkładanego wiązania, a tym samym z większą skutecznością w degradacji chityny ściany komórkowej badanych gatunków grzybów.

Perspektywy wykorzystania uzyskanych wyników

Wyniki badań laboratoryjnych pokazały, że chitynazy wyizolowane z hodowli bakteryjnej mają zdolność do inhibicji wzrostu grzybni wybranych gatunków fitopatogena, chociaż w ograniczonym zakresie. Dotychczas przeprowadzone badania otwierają nowe perspektywy badawcze dotyczące stymulacji i stabilizacji chitynaz po ich wyizolowaniu z hodowli. Zapewne dobrym rozwiązaniem mogą być próby immobilizacji tych enzymów i testowanie ich aktywności w warunkach polowych. Moim zdaniem, warto także zainicjować badania nad opracowaniem skutecznej metody uzupełnienia chemicznych fungicydów preparatami chitynaz bakteryjnych.

W badaniach wykazałam, że wyższą aktywność fungistatyczną wykazują bakterie - syntetyzujące chitynazy, niż wyizolowane enzymy. Wskazuje to na wieloczynnikowość antagonizmu bakterii, w którym obok chitynaz ważną rolę odgrywać mogą 1,3 -glukanazy, proteazy, antybiotyki, siderofory oraz inne biologicznie aktywne metabolity. W mojej ocenie skuteczniejsze a przy tym mniej kosztochłonne i pracochłonne byłoby zastosowanie w biopreparatach komórek bakterii niż wyizolowanych chitynaz.

Warto także podkreślić, że najbardziej wrażliwe na działanie wyizolowanych chitynaz okazały się gatunki patogenów z rodzaju *Fusarium*: *F. culmorum* i *F. oxysporum*. Taka konkluzja podnosi znaczenie uzyskanych wyników, ponieważ grzyby *Fusarium* powodują duże straty w plantacjach roślin uprawnych, a ich mikotoksyny po spożyciu mogą być przyczyną problemów zdrowotnych. Porażenie grzybami *Fusarium* obserwuje się zarówno w przypadku zbóż drobnoziarnistych (pszenicy, pszenżyta, jęczmienia, żyta i owsa) jak również gruboziarnistej kukurydzy. Rośliny mogą być porażane zarówno przed- jak i po wschodach, co obniża ich wartość handlową i konsumpcyjną. W ziarnie kumulują się przede wszystkim mikotoksyny z grupy trichotecenów: deoksyniwalenol i niwalenol, które oprócz właściwości toksycznych dla konsumenta mają także działanie fitotoksyczne, m.in. hamują kiełkowanie nasion (Packa i Śliwińska, 2005).

Podsumowanie najważniejszych wyników, które stanowią osiągnięcie naukowe zawarte w jednotematycznym cyklu publikacji pt. „**Ryzosferowe bakterie chitynolityczne i ocena ich przydatności do biologicznego zwalczania fitopatogenicznych grzybów pleśniowych**”.

Choroby grzybowe roślin uprawnych, pomimo ciągłego stosowania chemicznych preparatów, powodują rosnące zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Problem ten zainspirował mnie do podjęcia badań nad możliwościami biologicznego zwalczania fitopatogenicznych grzybów pleśniowych. Chitynolityczne bakterie i/lub ich wyizolowane chitynazy mogą stanowić alternatywę lub uzupełnienie stosowanych obecnie fungicydów. Jak dotąd brak jest danych literaturowych dotyczących występowania bakterii chitynolitycznych w strefie ryzosferowej zbóż najpowszechniej uprawianych w Polsce. Dlatego podjęłam pionierskie w skali kraju badania mające na celu wyjaśnienie, czy bakterie chitynolityczne występują w ryzosferze zbóż i czy wytwarzane przez nie chitynazy skutecznie hamują wzrost i rozwój grzybów pleśniowych. Podczas realizacji badań posługiwałam się różnorodnymi technikami stosowanymi w mikrobiologii, biochemii oraz biologii molekularnej.

Niezbędnym, choć wstępnym etapem badań było uzyskanie odpowiedniego materiału doświadczalnego. Wybrane do badań izolaty bakterii, po ich identyfikacji gatunkowej namnażałam na pożywkach płynnych, tak ustalając skład podłoża hodowlanego, aby aktywność wydzielanych chitynaz była jak najwyższa. Następnie tak dobierano techniki chromatograficzne, aby pozwoliły na oczyszczenie białek enzymatycznych i zachowanie ich aktywności w stopniu umożliwiającym przeprowadzenie testów z udziałem grzybowych fitopatogenów i możliwie szerokiej charakterystyki tych enzymów. W chwili rozpoczęcia badań, w dostępnej literaturze nie znalazłam biochemicznej charakterystyki chitynazy bakterii z rodzaju *Stenotrophomonas maltophilia*. Opublikowanie moich, w pełni nowatorskich, wyników badań wypełniło istniejącą lukę literaturową. Ponadto, poważnym osiągnięciem było sklonowanie sekwencji genu kodującego chitynazę u tych bakterii i zarejestrowanie jej w odpowiednich bazach danych. Pokonanie tego etapu badań otworzyło mi nowe perspektywy badawcze, w których wykorzystuję rekombinowane białko tego enzymu (dane niepublikowane).

Należy podkreślić, że spośród kilku różnych chitynaz zidentyfikowanych w hodowlach bakterii *Paenibacillus* sp M4 i *Serratia plymuthica* MP44 wyselekcjonowałam tylko chitynazy charakteryzujące się aktywnością fungistatyczną oraz wyznaczyłam warunki ich optymalnego działania. Właściwości grzybobójcze stwierdziłam także u pojedynczych form endochitynaz syntetyzowanych przez bakterie *Stenotrophomonas maltophilia* i *Streptomyces albidoflavus*.

Wyniki tych badań wskazują, na to, że właściwości antagonistyczne bakterii *Paenibacillus* sp. M4 oraz *Serratia plymuthica* MP44 w stosunku do grzybów pleśniowych są cechą wieloczynnikową, zależną nie tylko od aktywności chitynaz. W swoich badaniach wykazałam, że w najbardziej wrażliwe na działanie chitynaz badanych bakterii są gatunki patogenów z rodzaju *Fusarium*: *F. culmorum* i *F. oxysporum*.

Piśmiennictwo

- Ahmadian** G., Degrassi G., Venturi V., Zeigler D. R., Soudi M., Zanguinejad P. *Bacillus pumilus* SG2 isolated from saline conditions produces and secretes two chitinases. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(4), 1081-1089.
- Alam** M.D.M., Mizutani T., Isono M., Nikaidou N., Watanabe T. Three chitinase genes (chiA, chicC and ChiD) comprise the chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12. *J. Ferm. Bioeng.*, 1996, 82, 28-36.
- Arnon** R. Papain, in *Methods in Enzymology*, Vol. 19: Proteolytic Enzymes (Perlmann G. E. and Lorand L., eds), 226—244. Academic Press, 1970, New York.
- Baraldi** E., Mari M., Chierici E., Pondrelli M., Bertolini P., Pratella G.C. Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears: pathogenic fitness and genetic characterization. *Plant Pathol.*, 2003, 52, 362–370.
- Bennett** J.W., Klich M.. Mycotoxins. *Clin Microbiol. Rev.*, 2003, 36, 497-516.
- Bentley** S. D., Chater K. F., Cerdeno-Tarraga A. M. Challis G. L., Thomson N. R., James K. D., Bateman A. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature*, 2002, 417, 141-147.
- Bhattacharya** D., Nagpure A., Gupta R. K. Bacterial chitinases: properties and potential. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2007, 27, 21-28.
- Bowman** S.M., Free S.J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*, 2006, 28, 799-808.
- Brameld** K. A., Goddard W.A. The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases. *PNAS*, 1998, 95(8), 4276-4281.
- Buyer** J. S. A Soil and Rhizosphere Microorganism Isolation and Enumeration Medium That Inhibits *Bacillus mycoides*. *Appl. Envir. Microbiol*, 1995, 61(5), 1839-1842.
- Cantarel** B. L., Coutinho P. M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res.*, 2009, 37(suppl 1), D233-D238.

- Chang W. T.**, Chen C. S., Wang S. L. An antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus* with shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Curr. Microbiol.*, 2003, 47(2), 102-108.
- Chelkowski J.** Mikotoksyny, grzyby toksynotwórcze i mikotoksykozy. On line [www. cropnet. pl/mycotoxin](http://www.cropnet.pl/mycotoxin), 2, 2012.
- Choudhury S.R.**, Ghosh M., Mandal A., Chakravorty D., Pal M., Pradhan S., Goswami A. Surface-modified sulfur nanoparticles: an effective antifungal agent against *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum*. *Methods and Protocols. Appl. Microbiol. Biotech.*, 2011, 90, 733–743.
- Cook R. J.**, Baker K. F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. APS. ISBN: 0-89054-053-5, 1983.
- Crossman L. C.**, Gould V. C., Dow J. M., Vernikos G. S., Okazaki A., Sebahia M., Adlem E. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol.*, 2008, 9, R74.
- Felse P.A.**, Panda T. Regulation and cloning of microbial chitinase genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 51, 141-151.
- Frederiksen R. F.**, Paspaliari D. K., Larsen T., Storgaard B. G., Larsen M. H., Ingmer H., Palcic M.M, Leisner J. J. Bacterial chitinases and chitin-binding proteins as virulence factors. *Microbiol.*, 2013, 159, 833-847.
- Gohel V.**, Singh A., Vimal M., Ashwini P., Chhatpar H. S. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms *African J. Biotech.*, 2006, 5, 54-72.
- Gokul, B.**, Lee, J. H., Song, K. B., Rhee, S. K., Kim, C. H., & Panda, T. Characterization and applications of chitinases from *Trichoderma harzianum*—a review. *Bioprocess Engineering*, 2000, 23(6), 691-694.
- Grobelak A.**, Napora A., Kacprzak M. Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. *Ecol. Engin.*, 2015,84, 22-28.
- Hashimoto M.**, Ikegami T., Seino S., Ohuchi N., Fukada H., Sugiyama J., Shirakawa M., Watanabe T. Expression and characterization of the chitin-binding domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12. *J. Bacteriology*, 2000, 182, 3045-3054.
- Henrissat B.** A classification of glycosyl hydrolases based on aminoacid sequence similarities. *Biochem J.*, 1991, 280, 309-316.
- Miyamoto K.**, Okunishi M., Nukui, E., Tsuchiya T., Kobayashi T., Imada C. Tsujibo H. The regulator CdsS/CdsR two-component system modulates expression of genes involved in chitin degradation of *Pseudoalteromonas piscicida* strain O-7. *Arch. Microbiol.*, 2007, 188, 619-628.
- Morimoto K.**, Karita S., Kimura T., Sakka K., Ohmiya K. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding *Clostridium paraputrificum* chitinases ChiB and analysis of the functions of novel cadherin-like domains and chitin-binding domain. *J. Bacteriol.* 1997, 179, 7306-7314.

- Okorski A.**, Oszako T., Nowakowska J. A., Pszczolkowska A. Możliwości biologicznej ochrony roślin przed chorobami w szkółkarstwie, ze szczególnym uwzględnieniem lęgniowców (*Oomycetes*) i grzybów z rodzaju *Fusarium*. *Leśne Prace Badawcze*, 2014, 75, 301-321.
- Packa D.**, Sliwiska, E. Trichothecene fusarial toxins perturb the cell cycle in meristem-atic cells of *Secale cereale* L., *Triticum aestivum* L. and *Vicia faba* L. *Caryologia*, (2005). 58(1), 86-93.
- Patil R. S.**, Ghormade V., Deshpande M. V. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, 26, 473-483.
- Qin X.**, Xiao H., Xue C., Yu Z., Yang R., Cai Z., Si L. Biocontrol of gray mold in grapes with the yeast *Hanseniaspora uvarum* alone and in combination with salicylic acid or sodium bicarbonate. *Postharvest Biol. Tech.*, 2015, 100, 160-167.
- Ruiz-Herrera J.** Fungal cell wall: structure, synthesis, and assembly. CRC Press, 1991.
- Sahai A.S.**, Manocha M.S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2006, 1,317-338.
- Saks E.**, Jankiewicz U. Aktywność chitynolityczna bakterii. *Post. Bioch.* 2010, 56: 427-434
- Schoffemeer E. A.**, Klis F. M., Sietsma J. H., Cornelissen B. J. The cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Gen. Biol.*, 1999, 27, 275-282.
- Singh A. K.**, Chhatpar, H. S. Purification, characterization and thermodynamics of antifungal protease from *Streptomyces* sp. A6. *J. Basic Microbiol.*, 2011, 51(4), 424-432.
- Solarska E.**, Marzec M. Mycotoxins in cereal products from organic cultivation. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 2012, 57, 103-108.
- Sterflinger K.** Fungi as geologic agents. *Geomicrobiology J.*, 2000,17(2), 97-124.
- Vaaje-Kolstad G.**, Horn S.J., van Aalten D.M.F., Synstad B., Eijsink V.G.H. The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, 28492-28497.
- Van Aalten D.M.F.**, Komander D., Synstad B., Gåseidnes S., Peter M. G., Eijsink V. G. H. Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exochitinase. *PNAS*, 2001, 98, 8979-8984.
- Vessey J.K.** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*, 2003, 255, 571-586.
- Vuong T.V.**, Wilson D.B. Glycoside hydrolases: catalytic base/nucleophile diversity. *Biotechnol Bioengineer*, 2010, 107, 195-205.
- Yano S.**, Rattanakit N., Honda A., Noda Y., Wakayama M., Plikomol A., Tachiki T. Purification and characterization of chitinase A of *Streptomyces cyaneus* SP-27: an enzyme participates in protoplast formation from *Schizophyllum commune* mycelia. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 2008, 72, 54-61.

5 Omówienie pozostałych osiągnięć badawczo – naukowych

Na mój dotychczasowy dorobek naukowy składają się cztery zasadnicze obszary tematyczne:

- 5.1 Bakteryjne enzymy proteolityczne
- 5.2 Bioaktywne metabolity syntetyzowane przez bakterie ryzosferowe
- 5.3 Mikrobiologiczna biodegradacja polimerów polisacharydowych
- 5.4 Występowanie i rola drobnoustrojów w środowisku naturalnym

Ad 5.1

Badania nad proteazami bakteryjnymi stanowiły kontynuację tematyki pracy doktorskiej pt. „Właściwości molekularne aminopeptydaz bakterii glebowych *Pseudomonas* sp.” W badaniach, prowadzonych w ramach tej dysertacji, dokonałam szczegółowej charakterystyki biochemicznej dwóch kluczowych dla wewnątrzkomórkowego rozkładu białek, aminopeptydaz: alanylowej i fenyloalanylowej, syntetyzowanych przez glebową bakterię *Pseudomonas* sp. Zastosowanie technik elektroforezy preparatywnej oraz chromatografii nisko – i wysokociśnieniowej pozwoliło mi na uzyskanie aktywnych, homogennych białek badanych aminopeptydaz. Oczyszczone białka enzymatyczne scharakteryzowano m.in. pod względem optymalnych warunków ich działania, specyficzności substratowej, stabilności termicznej, wrażliwości na aktywatory i inhibitory proteaz. Uzyskane wyniki stały się podstawą prac opublikowanych w *Folia Microbiologica*, *Journal of Basic Microbiology* oraz *Acta Microbiologica Polonica* (zał.3., pkt IIa, poz. 12 - 14; pkt IIb 17). Szczegółową charakterystykę aminopeptydaz bakteryjnych przedstawiono w pracy przeglądowej (zał.3., pkt IIb, poz. 25).

W dalszych badaniach nad proteazami bakteryjnymi skupiałam się przede wszystkim na zewnątrzkomórkowych endo - i egzopeptydazach. W tych doświadczeniach wykorzystywałam nabyte podczas studiów doktoranckich umiejętności technik chromatograficznych i elektroforetycznych, ale w części badań wprowadziłam też podstawowe techniki biologii molekularnej. W omawianych pracach zwracałam szczególną uwagę na optymalizację warunków produkcji tych enzymów w hodowlach bakterii a następnie ich oczyszczeniu i poddaniu charakterystyce biochemicznej. Z punktu widzenia funkcjonowania tych peptydaz w środowisku glebowym istotne było szczegółowe zbadanie ich optymalnych warunków działania, stabilności oraz wpływu na ich aktywność potencjalnych inhibitorów i stabilizatorów. Efektem

przeprowadzonych badań nad proteazami, było opublikowanie kilku oryginalnych prac naukowych (zał.3, pkt IIa, poz. 9 - 11; pkt IIb, poz. 5, 7, 14, 16), a także prezentacja wyników podczas konferencji krajowych i zagranicznych (zał.3, pkt VIIb, poz. 21-23). Obecnie są prowadzone doświadczenia dotyczące rozkładu odpadów keratynowych przez bakterie z rodzaju *Stenotrophomonas*, zapoczątkowane w ramach projektu NCN (zał.3, pkt VI, poz. 1). Badany jest udział keratynaz i reduktaz disulfidowych w procesie hydrolizy piór ptasich i sierści zwierząt. Ponadto, badania te ukierunkowano na testowanie aktywności nicienobójczej oczyszczonych proteaz keratynolitycznych. Tej tematyki dotyczy właśnie przyjęta do druku w Journal of Bioscience and Bioengineering publikacja pt.: „Production, characterization, gene cloning, and nematocidal activity of the extracellular protease from *Stenotrophomonas maltophilia* N4” (zał.3, pkt IIa, poz.1).

Ad 5.2

Drugim, ważnym nurtem tematycznym moich badań było zagadnienie bioaktywnych metabolitów bakterii ryzosferowych, powodujących stymulację wzrostu roślin. Izolacja oraz identyfikacja kilkudziesięciu szczepów bakteryjnych z ryzosfery roślin zbożowych zapewniła mi wieloletni warsztat badawczy do tego typu badań. Bakterie z rodzaju *Pseudomonas* były najliczniejsze w mojej kolekcji szczepów i wykazały one zdolność do syntezy wielu związków o działaniu fungistatycznym. Zasadniczym celem tych doświadczeń było wyjaśnienie roli wybranych metabolitów w biologicznej ochronie roślin. Swoje badania, w tej tematyce ukierunkowałam na siderofory, chelaty żelaza wydzielane przez większość bakterii w warunkach niedoboru dostępnych, rozpuszczalnych form żelaza w środowisku ich bytowania. Związki te są zwykle charakterystyczne dla danego rodzaju lub nawet gatunku bakterii. Bakterie z rodzaju *Pseudomonas* w warunkach niedoboru żelaza mogą wydzielać kilka różnych pod względem struktury chemicznej i powinowactwa do jonów żelaza sideroforów, np. piowerdynę oraz pochodne kwasu salicylowego-pseudomoninę i piochelinę. Głównym sideroforem tych bakterii jest piowerdyna, wyróżniająca się wyjątkowo dużą siłą wiązania jonów żelaza. Właśnie, dlatego piowerdyna ma największe znaczenie w zapewnieniu bakterii konkurencyjności i przeżywalności w zasiedlanym środowisku. Należy także podkreślić duże znaczenie tego chelatu żelaza w ograniczaniu chorób grzybowych roślin. Siderofor ten w literaturze naukowej jest opisywany nie tylko, jako elicytor indukowanej systemicznej odporności roślin typu ISR, ale także, jako bioaktywny metabolit hamujący wzrost drobnoustrojów, w tym fitopatogenów

grzybowych. Przeprowadzone przeze mnie badania potwierdziły hamujące działanie piowerdyny na wzrost grzybni fitopatogenów, spowodowane ograniczonym dostępem żelaza w środowisku. Ponadto podjęłam próbę wzbudzenia w roślinach jęczmienia indukcji odporności typu ISR w obecności bakterii syntetyzujących piowerdynę. Jednak ta część badań wymaga kontynuacji w celu optymalizacji warunków interakcji: roślina-bakteria - grzyb fitopatogeniczny. Prezentowane doświadczenia były częściowo finansowane w 2007 r. z grantu SGGW pt: „Znaczenie sideroforów jako biologicznych czynników polepszania zdrowotności roślin zbożowych”, którego byłam kierownikiem. Wyniki badań nad chelatami żelaza opublikowałam w trzech artykułach oryginalnych (zał.3, pkt IIb, poz. 11, 12, 15) . W efekcie zainteresowań tą tematyką powstały także dwie prace przeglądowe (zał.3, pkt IIa, poz. 15; pkt IIb, poz. 24) oraz doniesienia konferencyjne (zał.3, pkt VIIb, poz. 19-20). Dalsze badania nad bioaktywnymi metabolitami ukierunkowano na detekcję w hodowlach bakterii z rodzaju *Pseudomonas* potencjalnie fungistatycznych substancji takich jak, cyjanowodór i kwas salicylowy, a także enzymów rozkładających ściany komórkowe grzybów: chitynaz i β -1,3 glukanz (zał.3, pkt IIb, poz. 4, 10; zał.3, pkt VIIa, poz. 2-3).

Ad 5.3

Prace dotyczące biodegradacji naturalnych polimerów polisacharydowych przez enzymy pochodzenia mikrobiologicznego powstały jako efekt mojej współpracy naukowej z Samodzielnym Zakładem Biologii Mikroorganizmów Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW. Tematyka wspólnych badań dotyczyła enzymatycznego rozkładu ligniny (zał.3, pkt IIa, poz. 5; pkt VIIb poz. 6, 8), celulozy (zał.3, pkt IIb, poz.1; pkt VIIb, poz. 5) oraz ksylanów (zał.3, pkt IIb, poz. 9). Mój udział w tych pracach polegał głównie na optymalizacji warunków reakcji, wyborze substratów i wykonaniu oznaczeń enzymatycznych.

Ad 5.4

W ramach ostatniego z wcześniej wymienionych zagadnień, dotyczącego występowania i roli drobnoustrojów w środowisku naturalnym byłam współautorem badań nad występowaniem i liczebnością bakterii w glebach zanieczyszczonych (zał.3, pkt VIIb, poz. 4), biosorpcją metali ciężkich przez bakterie z rodzaju *Pseudomonas* i *Bacillus* (zał.3, pkt IIb, poz. 13; zał.3, pkt VIIb, poz. 17), aktywnością bakterii ryzosferowych w oczyszczalni hydrobotanicznej (zał.3, pkt IIa, poz. 4), a także nad bakteriami redukującymi siarczany (zał.3, pkt IIa, poz. 3).

Brałam także udział w badaniach nad występowaniem i znaczeniem bakterii cyklu azotowego oraz *Escherichia coli* w wodach rzecznych i zbiornikach wodnych (zał.3, pkt IIb, poz. 3, 6; pkt VIIa, poz. 1; pkt VIIb, poz. 7). W ostatnich latach byłam także współautorem badań nad biodegradacją polimerów syntetycznych (zał.3, pkt IIa, poz. 2; zał.3, pkt VIIb, poz. 2-3).

Część z tych badań będzie nadal kontynuowana z wykorzystaniem bardziej zaawansowanych technik biochemicznych i biologii molekularnej.

Warto także zaznaczyć, że w latach 2007-2011 uczestniczyłam w badaniach realizowanych w ramach projektu zamawianego pt. „Ruchome elementy genetyczne bakterii – analiza molekularna oraz wykorzystanie do konstrukcji nowych narzędzi dla przemysłu biotechnologicznego” koordynowanego przez Instytut Biochemii i Biofizyki PAN we współpracy z Katedrą Biochemii SGGW (zał. 3, pkt VI, poz. 3). Jako jeden z wykonawców zadania: „Nadprodukcja i oczyszczanie wybranej endoproteazy faga A5W” zajmowałam się proteomiką faga A5W *Staphylococcus aureus*. Głównym celem tych badań było udowodnienie, że w procesie dojrzewania główki faga niezbędna jest aktywność endoproteaz (proteaz preglówki), których funkcją jest procesowanie głównego białka kapsydu. Miejsce proteolitycznego cięcia udało się nam wskazać, dzięki uzyskaniu N-końcowej sekwencji białka kapsydu. W ramach tego projektu przeprowadzono także badania prowadzące do uzyskanie nadprodukcji peptydazy faga A5W oraz białka kapsydu w komórkach *E. coli*. Uzyskane w ten sposób białka rekombinowane były oczyszczone i wykorzystane w dalszych badaniach nad właściwościami biochemicznymi. Zastosowanie technik biologii molekularnej pozwoliło na uzyskanie dodatkowego potwierdzenie udziału proteazy preglówki w procesowaniu białka kapsydu u faga A5W. Efektem tej współpracy były dwa doniesienia konferencyjne (zał.3, pkt VIIb, poz. 15-16), w tym jedno na konferencji zagranicznej (poz. 15).

Obecnie, interesującym tematem moich badań wydają się być zewnątrzkomórkowe enzymy wydzielane przez grzybnie trufli letniej (*Tuber aestivum*). Jak dotąd udało się wykryć w płynnej hodowli trufli kilka aktywności enzymatycznych: lakazy, proteazy, lipazy oraz celulazy i ksylanazy (zał. 3., pkt IIb, poz. 2; pkt VIIb, poz.8-9). Kontynuacją tych badań będzie próba oczyszczenia wybranych białek enzymatycznych z podłoża hodowlanego i ich charakterystyka. Doświadczenia te są

prowadzone we współpracy naukowej z Instytutem Badawczym Leśnictwa w Sękocinie.

Podsumowanie ilościowe dotychczasowego dorobku publikacyjnego.

Mój całkowity dorobek publikacyjny stanowią **72** prace, z czego **46** to prace naukowe, **23** streszczenia konferencyjne, **1** publikacja popularnonaukowa, **2** rozdziały w skryptach akademickich.

Mój dorobek naukowy obejmuje **46** prac w czasopismach recenzowanych, z czego: **36** stanowią oryginalne publikacje, **10** publikacje przeglądowe.

Łącznie jestem współautorem **21** prac w czasopismach z bazy Journal Citation Reports (JCR). Sumaryczna wartość współczynnika IF wynosi: **26,592**. Sumaryczna liczba punktów według listy MNiSW, zgodnie z czasem opublikowania prac wynosi **514**.

Liczba cytowań według bazy Web of Science (All Databases): **79**, bez autocytowań: **57**, Indeks Hirscha według bazy Web of Science: **6**.

Mój dorobek naukowy niewliczający się do osiągnięcia naukowego, stanowiącego jednotematyczny cykl publikacji, wynosi **399** pkt MNiSW, wartość współczynnika IF wynosi: **19,562**.

Zestawienie liczbowe opublikowanych prac

Rodzaj publikacji	Ilość
1. Oryginalne prace twórcze (a+b)	36
a. w czasopismach z bazy JCR	19
-w języku angielskim	19
-w języku polskim	0
b. w czasopismach spoza bazy JCR	17
-w języku angielskim	6
-w polskim	11
2. Przeglądowe prace (a+b)	10
a. w czasopismach z bazy JCR	2
-w języku angielskim	2
-w polskim	0
b. w czasopismach spoza bazy JCR	8
-w języku angielskim	2
-w języku polskim	6
3. Prace popularno-naukowe	1
-w języku angielskim	0
-w języku polskim	1
4. Streszczenia konferencyjne	23
-w języku angielskim	14
-w języku polskim	9
5. Autorstwo rozdziałów w skryptach	2
Razem 1+2+3+4+5	72