

Lublin, 27 listopada 2023

Prof. dr hab. Monika Janczarek
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Wydział Biologii i Biotechnologii
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
tel. 81-537-59-09, monika.janczarek@mail.umcs.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Weroniki Babińskiej-Wensierskiej

pt. "Characterisation of the *Pectobacterium aquaticum* isolated from Polish water in addition to studying the selected virulence and environmental factors important for development of potato blackleg and soft rot diseases"

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Łojkowskiej i promotora pomocniczego dr Agaty Motyki-Pomagruk w Zakładzie Ochrony i Biotechnologii Roślin Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, w dziedzinie nauk biologicznych, w dyscyplinie biotechnologia

Ocena formalna pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Weroniki Babińskiej-Wensierskiej jest cyklem czterech, powiązanych tematycznie prac opatrzonych wspólnym tytułem: Characterisation of the *Pectobacterium aquaticum* isolated from Polish water in addition to studying the selected virulence and environmental factors important for development of potato blackleg and soft rot diseases. Rozprawa ma format hybrydowy i składa się z dwóch prac opublikowanych w renomowanych czasopismach z listy JCR (**Int. J. Environ. Res. Public Health** -140 pkt., IF₂₀₂₃=4,614 i **Carbohydr. Res.** – 100 pkt., IF₂₀₂₃=2,975) oraz dwóch anglojęzycznych manuskryptów wysłanych do recenzji.

W skład cyklu wchodzi:

1. **Babińska W.**, Motyka-Pomagruk A., Śledź W., Kowalczyk A., Kaczyński Z., Łojkowska E. The First Polish Isolate of a Novel Species *Pectobacterium aquaticum* Originates from a Pomeranian Lake. **Int. J. Environ. Res. Public Health**. 2021;18(9):5041.
2. Kowalczyk A., Szpakowska N., **Babińska W.**, Motyka-Pomagruk A., Śledź W., Łojkowska E., Kaczyński Z. The structure of an abequose - containing O-polysaccharide isolated from *Pectobacterium aquaticum* IFB5637. **Carbohydr. Res.** 2022, 522:108696.

3. **Babińska-Wensierska W.**, Motyka-Pomagruk A., Mengoni A., diCenzo GC., Łojkowska E. The search for foundations of virulence in an economically significant plant pathogen *Dickeya solani* via transcriptomic profiling; manuskrypt 1.
4. **Babińska-Wensierska W.**, Motyka-Pomagruk A., Fondi M., Misztak AE., Mengoni A., Łojkowska E. Differences in the constituents of bacterial microbiota in relation to soil suppressiveness towards potato blackleg and soft rot diseases; manuskrypt 2.

Wszystkie prace są wieloautorskie (5-7 autorów). Po zapoznaniu się z publikacjami, które są wyjątkowo obszerne i zawierają bardzo dużą liczbę przeprowadzonych analiz z zastosowaniem różnych technik badawczych, w mojej ocenie liczba współautorów jest adekwatna do wykonanych badań. Po zapoznaniu się z oświadczeniami Współautorów oraz Doktorantki jestem w pełni przekonana, iż miała Ona wiodący udział w ich powstawaniu. Doktorantka jest pierwszym Autorem w trzech pracach oraz trzecim Autorem w jednej pracy (Carbohydr. Res.). Brała udział w opracowywaniu koncepcji i metodologii badań, wykonywała znaczną część doświadczeń, przeprowadzała analizę uzyskanych wyników, przygotowywała manuskrypty i czynnie brała udział w procesie publikacyjnym.

Cykl publikacji zawartych w rozprawie Doktorantka poprzedziła dobrze opracowanym wstępem teoretycznym, przedstawiła cel pracy, materiały i metody, omówiła wyniki oraz przedstawiła najważniejsze osiągnięcia i wnioski. Trudnym zadaniem było zawrzeć w syntetycznym opisie wyniki tak obszernych badań, ale Doktorantka świetnie sobie z tym poradziła. Ponadto, Doktorantka przedstawiła swoje dotychczasowe osiągnięcia naukowe i aktualnie realizowane zadania badawcze, co pozwoliło Recenzentowi utwierdzić się w przekonaniu, że mgr Weronika Babińska-Wensierska jest bardzo ambitną, utalentowaną i pracowitą osobą. Świadczy o tym, m.in. współautorstwo 10 publikacji, 1 rozdziału w książce, 3 manuskryptów wysłanych do recenzji, 2 patentów i 5 zgłoszeń patentowych krajowych i 1 zgłoszenia europejskiego, udział w licznych konferencjach naukowych (44), kursach i szkoleniach, odbycie 3 staży (w tym, jednego 3-mies. na Uniwersytecie we Florencji) oraz udział w realizacji 8 różnych projektów naukowych jako wykonawca (Harmonia 6, Innovation Incubator 2.0, 4.0, OPUS 23, Sonata 15, Preludium 11) oraz kierownik (Preludium 21). Dzięki ogromnemu doświadczeniu naukowemu i wsparciu merytorycznemu Profesor Ewy Łojkowskiej i dr Agaty Motyki-Pomagruk, Doktorantka mogła uzyskać wiele wartościowych wyników o dużym potencjale aplikacyjnym. Przyczyniło się to do powstania rozprawy doktorskiej na bardzo wysokim poziomie naukowym.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Bakterie z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya* (Soft Rot *Pectobacteriaceae*, SRP) wywołują chorobę mokrej zgnilizny bulw ziemniaka, która powoduje duże straty w uprawie i przechowywaniu plonów tych roślin. Mimo licznych starań, nadal najbardziej skutecznym sposobem rozwiązania tego problemu jest monitorowanie występowania patogenicznych szczepów tych bakterii i ich eliminacji z różnych nisz

ekologicznych, w tym z miejsc przechowywania plonów. Stąd, tematyka badawcza podjęta przez mgr Weronikę Babińską-Wensierską i zespół Prof. Ewy Łojkowskiej jest wciąż aktualna i bardzo ważna. Cel rozprawy został jasno i zwięźle przedstawiony. Doktorantka konsekwentnie realizowała postawione sobie szczegółowe cele badawcze. W pierwszym etapie badań (praca 1), Doktorantka przebadła liczne próbki pochodzące z różnych głębokości 9 jezior Polski północnej w celu wykrycia obecności SRP oraz scharakteryzowania różnorodności genetycznej i fenotypowej otrzymanych szczepów. Przeprowadzono kompleksowe badania z zastosowaniem różnorodnych technik molekularnych (ERIC-PCR, multiplex-PCR, filogeneza konserwatywnych genów *dnaX* i *recA*), metod biochemicznych (API) i mikrobiologicznych (ocenę wirulencji, ruchliwości, tolerancji na czynniki stresowe, syntezę sideroforów, tworzenie biofilmu). Co ciekawe, Doktorantka wykazała, że SRP są obecne jedynie przy powierzchni wody (0 m), dlatego woda z głębszych warstw jezior może być bezpiecznie stosowana przez rolników do nawadniania upraw. Co należy podkreślić, Doktorantka podczas realizacji tego zadania badawczego, zidentyfikowała wśród uzyskanych izolatów po raz pierwszy w kraju szczep należący do gatunku *Pectobacterium aquaticum*.

W drugiej pracy (Carbohydr. Res.), Doktorantka poddała analizie chemicznej strukturę części O-swoistej lipopolisacharydu szczepu *P. aquaticum* IFB5637, który został wyizolowany w ramach realizacji pierwszego zadania badawczego. Wykazano, że OPS LPS tego szczepu, oprócz dwóch powszechnie występujących heksoz (mannozy i glukozy), dodatkowo zawiera nietypowy cukier 3,6-dideoksy-D-ksyloheksozę (abequose), który został po raz pierwszy wykryty przez Doktorantkę w LPS szczepów należących do rodziny *Pectobacteriaceae*. Jest to bardzo ciekawe spostrzeżenie, które może zostać w przyszłości wykorzystane aplikacyjnie.

Kolejne wyniki uzyskane przez Doktorantkę opisano w części pracy, oznaczonej jako manuskrypt 1. Ze względu na fakt, iż szczepy należące do gatunku *Dickeya solani* wyróżniają się wyższą wirulencją w porównaniu do innych gatunków *Dickeya*, Doktorantka podjęła się wyjaśnienia jakie markery genetyczne mogą być odpowiedzialne za to zjawisko. W tym celu przeprowadzono porównawczą analizę metylacji genomów oraz transkryptomów dwóch szczepów *D. solani* różniących się znacząco poziomem wirulencji (wysoce wirulentny IFB0099 i o niższej wirulencji IFB0223). W przypadku metylacji genomów tych szczepów nie wykazano znaczących różnic w częstości występowania motywów podlegających metylacji (3 rodzaje motywów były analizowane), jak też w profilach ich metylacji, co wykluczyło istotny wpływ tego typu modyfikacji DNA na zróżnicowanie poziomu wirulencji między badanymi szczepami.

W przypadku analizy transkryptomicznej, dodatkowo postanowiono sprawdzić jak obecność kwasu poligalakturonowego (PGA), będącego jednym z trzech składników pektyn występujących w ścianie roślin, wpływa na ekspresję genów szczepów *D. solani* IFB0099 i IFB0223. Doktorantka uzyskała bardzo ciekawe wyniki z tej części badań. Wykazała, że PGA w hodowli bakterii znacząco zmienia poziom ekspresji wielu genów w obu badanych szczepach. Jednak nie zaobserwowano znaczących różnic co do ilości genów

(wzrost ekspresji dla 546 i obniżenie dla 479 genów u IFB0099 oraz wzrost dla 466 i obniżenie dla 436 genów u IFB0223). Szczegółowa analiza porównawcza zmiany ekspresji (\log_2 fold change $>|1|$) w obu szczepach w warunkach kontrolnych i indukowanych PGA pozwoliła Doktorantce na zidentyfikowanie genów, których ekspresja zmieniała się w obecności PGA. Wśród nich znalazły się geny kodujące pektynazy (13 genów), proteazy (10), komponenty flagelli (15), związane z rozkładem oligogalakturonidów (KDG) (6) i systemem sekrecji typu 2 (4). Pewnym zaskoczeniem było dla mnie zaobserwowanie jedynie niewielkich różnic wartości \log_2 FC dla wielu istotnych genów w patogenezie tych bakterii pomiędzy wysoce wirulentnym szczepem a szczepem o znacznie niższej wirulencji (np. dla pektynaz *pelD*, *pelE*, *pelL*, *pemA*). Co ciekawe, ekspresja genów pektynaz *pehV* i *pehW* obniżała się w obecności PGA i to jeszcze bardziej znacząco w szczepie silnie wirulentnym IFB0099 niż IFB0223. Natomiast zgodnie z oczekiwaniem większe różnice między szczepami wykazano dla proteaz (*prtD*, *prtE* i *prtI*) i większości genów związanych z ruchliwością. Jednak generalnie zaobserwowane zmiany ekspresji po indukcji PGA znaczącej liczby genów związanych z wirulencją *D. solani* są niezbyt wysokie. Jak Doktorantka skomentowałaby te wyniki? Do tej części badań mam kilka pytań/sugestii. W rozprawie nie znalazłam tabel S3 i S4 ze spisem genów o zróżnicowanej ekspresji dla szczepów IFB0099 i IFB0223, z podziałem na poszczególne kategorie funkcjonalne COG i lub KEGG. Dane te wzbogaciłyby prezentowane wyniki. Ponadto, zestawienie w tabeli zbiorczej wartości \log_2 FC dla obu szczepów w warunkach indukowanych PGA i nieindukowanych znacznie ułatwiłoby analizę wyników, które zostały bardzo obszernie i szczegółowo opisane. Uwagi te nie umniejszają w istotnym stopniu mojej bardzo dobrej oceny wyników zawartych w tej części rozprawy. Uzyskane dane transkryptomyczne są bardzo ciekawe, wartościowe i dają kompleksowy obraz zmian ekspresji genów *D. solani* zachodzących pod wpływem indukcji PGA oraz różnic międzyszczepowych w takich warunkach. W tym miejscu prosiłabym Doktorantkę o wyrażenie opinii, które wyniki z tej części badań uważa za najważniejsze i/lub najbardziej zaskakujące w kontekście aktualnych danych literaturowych.

Następnie mgr Weronika Babińska-Wensierska skoncentrowała się na poznaniu różnic w składzie mikrobioty gleby standardowej (ang. non-suppressive soil) i gleby tłumiącej namnażanie się patogenów (ang. suppressive soil), w kontekście bakterii wywołujących choroby ziemniaka (czarnej nóżki i mokrej zgnilizny). Wyniki uzyskane w tej części badań zostały opisane w manuskrypcie 2. Autorka przebadła próbki gleb pochodzących z dwóch farm o odmiennej historii zakażeń bakteriami SRP i wykazała obecność szczepów należących do *Pectobacterium* spp. w glebie standardowej, podczas gdy ich brak w glebie tłumiącej patogeny. Dodatkowo, na podstawie analiz metagenomicznych z wykorzystaniem sekwencjonowania genu 16S rRNA scharakteryzowała strukturę mikrobioty tych gleb oraz opisała występujące między nimi różnice. Doktorantka potwierdziła, że „zdolność” gleby do tłumienia patogenów SRP wynika z jej dużego zróżnicowania mikrobiologicznego. Autorka zaobserwowała różnice w strukturze mikrobiologicznej badanych gleb (tj. większą liczebność mikroorganizmów w glebie tłumiącej do nietłumiącej) na różnych poziomach: gromady (dla 6 gromad), klasy (10), rzędu (13) oraz rodzaju.

Poczyniono ciekawe i ważne obserwacje, że bakterie z rodzajów *Bacillus* i *Rummeliibacillus* mogą być odpowiedzialne za właściwości tłumiące patogeny w analizowanej glebie. Doktorantka potwierdziła swoimi wynikami dane literaturowe wskazujące, że reprezentanci rodzaju *Bacillus* są obecni częściej w glebie tłumiącej rozwój fitopatogenów porównaniu do gleby nietłumiącej SRP. W mojej ocenie, uzyskane informacje są bardzo wartościowe i mogą zostać w przyszłości wykorzystane do opracowania biologicznych preparatów.

Podsumowując, rozprawa doktorska została przygotowana w sposób bardzo staranny i przejrzysty, zarówno pod względem naukowym, jak też graficznym i edytorskim. Nie mam wątpliwości, że Doktorantka właściwie zaplanowała badania, wykonała ogrom pracy laboratoryjnej, opisała szczegółowo uzyskane wyniki, przeprowadziła analizę danych i wyciągnęła odpowiednie wnioski. Zawarte w rozprawie dwie prace są już opublikowane w renomowanych czasopismach i zostały poddane recenzjom. Ja również oceniam je bardzo pozytywnie. Wyniki zawarte w kolejnych dwóch manuskryptach zostały także szczegółowo opisane i bardzo dobrze graficznie opracowane, co pozwoliło docenić ich wartość naukową. W tym miejscu chciałabym zapytać Doktorantkę, jakie widzi możliwości biotechnologicznego zastosowania swoich wyników w rolnictwie? W konkluzji stwierdzam, że mgr Weronika Babińska-Wensierska w ramach przedstawionej rozprawy doktorskiej uzyskała bardzo dużo interesujących i wartościowych wyników. Doktorantka osobiście wykonała wiele eksperymentów i analiz z użyciem licznych próbek środowiskowych, szczepów bakteryjnych i różnorodnych technik z zakresu biologii molekularnej, bioinformatyki, mikrobiologii oraz biochemii. Dzięki dużemu zaangażowaniu, pracowitości i konsekwencji otrzymała dużą ilość wartościowych wyników, które przyczyniły się do poszerzenia naszej wiedzy w zakresie występowania oraz bioróżnorodności bakterii patogenicznych wywołujących choroby ziemniaka.

WNIOSEK KOŃCOWY

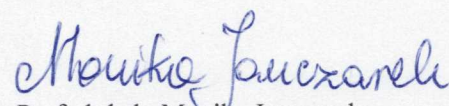
Stwierdzam, że praca doktorska mgr Weroniki Babińskiej-Wensierskiej pt.: „Characterisation of the *Pectobacterium aquaticum* isolated from Polish water in addition to studying the selected virulence and environmental factors important for development of potato blackleg and soft rot diseases” spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim (*Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r., Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce, Dz.U. z 2018 r., poz. 261, poz. 1669*), gdyż jest samodzielny i wartościowym dorobkiem naukowym, prezentującym wysoki poziom merytoryczny i ma znaczną wartość aplikacyjną. Doktorantka potwierdziła swoimi osiągnięciami i aktywnością naukową, że jest przygotowana do prowadzenia wieloaspektowych zadań badawczych.

W związku z powyższym, składam wniosek do Rady Dyscypliny Naukowej Biotechnologia Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Weroniki Babińskiej-Wensierskiej do publicznej obrony zawartych w niej tez.

Wyróżnienie rozprawy doktorskiej

Biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową i aplikacyjną recenzowanej rozprawy wnoszę o jej wyróżnienie. W uzasadnieniu stwierdzam, że mgr Weronika Babińska-Wensierska była bezpośrednio zaangażowana w ustalanie koncepcji badań, wykonała ogromną część zaplanowanych doświadczeń i analiz, uczestniczyła w opracowaniu uzyskanych wyników oraz przygotowywaniu manuskryptów do opublikowania. Dodatkowo znacząca część wyników została już opublikowana w dwóch wysoko punktowanych czasopismach, w których mgr Weronika Babińska-Wensierska jest pierwszym (Int. J. Environ. Res. Public Health. 2021, 140 pkt.) i trzecim autorem (Carbohydr. Res. 2022, 100 pkt. MEiN).

W związku z powyższym, **wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej** mgr Weroniki Babińskiej-Wensierskiej przez Radę Naukową Biotechnologia Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego stosowną Nagrodą.


Prof. dr hab. Monika Janczarek