

prof. dr hab. inż. Joanna Puławska
Instytut Ogrodnictwa - PIB
Zakład Ochrony Roślin
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3
96-100 Skierniewice

Skierniewice 28.09.2022

Recenzja pracy doktorskiej mgr. Tomasza Mikołaja Maciąga
„Synthetic consortium of bacterial strains protecting potato (*Solanum tuberosum* L.)
plants against pectinolytic bacteria: from Petri dish to the potato storage”

Przedstawiona do recenzji praca wykonana na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem dr. hab. Roberta Czajkowskiego, prof. UG dotyczy opracowania nowego syntetycznego konsorcjum szczepów bakterii antagonizujących względem patogenów roślin – bakterii pektynolitycznych z rodzaju *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp. oraz sposobu formułacji konsorcjum w celu jego późniejszego wykorzystania do ochrony bulw ziemniaka w warunkach ich przechowywania. Ochrona roślin nastęrcza producentom coraz większych trudności. Jest to spowodowane między innymi tendencją do ograniczania liczby substancji aktywnych pestycydów, przy jednocześnie narastającym zjawisku pojawiania się organizmów na nie odpornych. Ponadto, intensywne wymiana materiału roślinnego na rynkach międzynarodowych sprzyja rozprzestrzenianiu się obcych inwazyjnych agrofagów na nowe terytoria. Ochrona roślin przez bakteriozami zawsze była kłopotliwa, ze względu na niewielki asortyment środków bakteriobójczych dopuszczonych do użytku. W świetle polityki Unii Europejskiej i założeń strategii Europejskiego Zielonego Ładu, w perspektywie kolejnych lat mają być wycofane z ochrony roślin środki bazujące na solach miedzi, które są głównym orężem w walce z bakteriozami, a zużycie chemicznych środków ochrony roślin ma być zredukowane o 50%. W obecnej chwili w Polsce, nie ma żadnego zarejestrowanego środka do ochrony ziemniaka przed bakteriozami. W związku z tym, ważnym kierunkiem badań jest poszukiwanie biologicznych środków ochrony roślin i ma to odzwierciedlenie w rosnącej



liczbie publikacji naukowych dotyczących tej tematyki, a także w dynamicznie zwiększającej się wartości światowego rynku biopestycydów.

Przedstawiona do recenzji praca została przygotowana w języku angielskim i ma formę opublikowanych artykułów naukowych i rozdziału książki. Na rozprawę doktorską Pana mgr. T. M. Maciąga składają się trzy oryginalne, wieloautorskie prace naukowe opublikowane w latach 2019-2022, oraz rozdział książki mający charakter przeglądowny, w którym autorzy opisują obecny stan wiedzy dotyczący możliwości biologicznej ochrony z zastosowaniem preparatów opartych o konsorcja mikrobiologiczne. Wyniki prac badawczych zostały opublikowane w renomowanych anglojęzycznych czasopismach naukowych posiadających współczynnik wpływu IF (Impact Factor) o wartościach IF₂₀₂₁ 3,422; 5,56; 4,614 (sumaryczny IF = 13,596). Doktorant jest pierwszym autorem dwóch prac i równorzędnym pierwszym autorem trzeciej pracy oraz drugim autorem w rozdziale książki, opublikowanej przez wydawnictwo Springer. Wkład pracy Doktoranta w powstanie poszczególnych publikacji jest znaczący i mgr T. M. Maciąg opisuje go jako udział w przygotowaniu i wykonaniu prac eksperymentalnych, analiz danych, w tym również statystycznych, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptów lub udział w ich pisaniu.

Główna część pracy doktorskiej składająca się z opublikowanych artykułów naukowych poprzedzona jest streszczeniem w języku polskim i w języku angielskim, oraz rozdziałem **Popular Science Introduction** mającym charakter wprowadzenia do tematyki pracy. Rozdział ten, jak głosi jego tytuł, ma charakter popularnonaukowy, przedstawia przegląd informacji dotyczący mikrobiologii gleby, chorób roślin i biologicznej ochrony roślin. Napisany jest przyjemnym, lekkim językiem, co poczytuję jako zaletę, bo w sposób interesujący przekazuje solidną dawkę wiedzy.

Kolejna część rozprawy zawiera trzy monotematyczne, oryginalne prace naukowe. Pierwsza z prac, oznaczona 2.1, opublikowana w 2019 roku w czasopiśmie *Plant Disease* opisuje proces selekcji szczepów bakteryjnych o właściwościach antagonistycznych w stosunku do patogenicznych bakterii z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya*, i stworzenia konsorcjum bakteryjnego wykazującego efekt możliwie maksymalnej ochrony bulw ziemniaka przed mokrą zgnilizną powodowaną przez różne gatunki bakterii pektynolitycznych. Spośród 22, wcześniej scharakteryzowanych jako posiadających właściwości antagonistyczne szczepów bakterii, stworzono 15 konsorcjów bakteryjnych, do których przydzielano szczepy na zasadzie losowej i analizowano ich skuteczność w ochronie bulw ziemniaka przed mokrą zgnilizną. Poszczególne szczepy wchodzące w skład najbardziej efektywnego konsorcjum nazwanego

przez Autorów „Great Five” były również charakteryzowane indywidualnie pod kątem ich właściwości ochronnych, oraz cech fenotypowych jak wrażliwość na antybiotyki, zdolność do wzrostu w różnych temperaturach oraz wpływu na przeżywanie nicienia *Caenorhabditis elegans*. W przedstawionej publikacji, szczepy były identyfikowane na podstawie sekwencjonowania regionu 16S rRNA i porównania sekwencji z bazą GenBank z zastosowaniem algorytmu BlastN. Generalnie, zróżnicowanie sekwencji 16S rRNA jest obecnie dla większości rodzajów bakterii niewystarczające do poprawnej klasyfikacji do poziomu gatunku. Uważa się, że sekwencja 16S rRNA pozwala tylko na zgrubną klasyfikację do rodzaju. Pokusiłam się o sprawdzenie sekwencji 16S rRNA szczepów wchodzących w skład mieszaniny Great Five, i po porównaniu tych sekwencji z bazą sekwencji 16S rRNA szczepów typowych gatunków w bazie EzTaxon, szczep A167 zidentyfikowany w publikacji 2.1 jako *Enterobacter amnigenus*, został zaklasyfikowany do rodzaju *Lelliotta* (bez przypisania do gatunku), a szczep H145 zidentyfikowany w pracy jako *Rahnella aquatilis* do *Rahnella aceris*. Dla wszystkich tych szczepów Doktorant w kolejnej pracy uzyskał sekwencje genomowe. W związku z tym nasuwa się pytanie czy były prowadzone dalsze analizy mające na celu identyfikację szczepów z zastosowaniem porównania genomów? Ciekawi mnie też aspekt wzajemnych relacji szczepów tworzących konsorcjum. Z charakterystyki zamieszczonej w Tabeli 1 w publikacji 2.1 wynika, że część z nich może produkować substancje o charakterze antybiotyków, czy zatem były prowadzone szerzej zakrojone badania w celu odpowiedzi na pytanie, czy nie wpływają one wzajemnie na siebie negatywnie? Z tym pytaniem wiąże się kolejne zagadnienie przeżywalności pożytecznych szczepów w bulwach ziemniaka. Czy wiadomo jak długo szczepy konsorcjum są w stanie przeżywać na bulwach i czy przeżywalność poszczególnych szczepów jest zbliżona do siebie, czy może z upływem czasu któryś szczep dominuje nad pozostałymi? Kolejne zagadnienie to sprawa bezpieczeństwa badanych szczepów dla ludzi. Jest to sprawa niezwykle istotna podczas rejestracji szczepów bakteryjnych jako substancji aktywnych środków ochrony roślin. W publikacji 2.1 Autorzy deklarują, że na podstawie klasyfikacji opracowanej przez American Type Culture Collection (ATCC) jako szczepy należące do 1. grupy ryzyka, czyli generalnie uznawane za bezpieczne. Jednak wg europejskiej klasyfikacji DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) *Serratia rubidaea* jest zaklasyfikowana do 2. grupy ryzyka, czyli czynników związanych z chorobami ludzi, a to jest związane z doniesieniami naukowymi, w których opisywano przypadki identyfikacji bakterii tego gatunku u pacjentów.

Kolejna publikacja wchodząca w skład rozprawy doktorskiej, oznaczona jako 2.2, jest kontynuacją badań prowadzonych w ramach pierwszej publikacji i obejmuje próbę opracowania składu formułacji szczepów konsorcjum Great Five zapewniającej im dłuższą przeżywalność. Prace te mają już charakter bardziej aplikacyjny, wręcz przygotowujący konsorcjum bakteryjne do jego komercjalizacji. Opracowanie formułacji, która zapewniałaby dobrą przeżywalność wszystkim 5 szczepom konsorcjum jest generalnie trudne, bo często optymalny skład formułacji różni się dla szczepów należących do różnych gatunków. Doktorant w swojej pracy testował różne odczynniki, składniki oraz sposoby formułacji szczepów bakteryjnych, w tym zaproponował nowy odczynnik do liofilizacji, który chronił komórki bakterii w podobnym stopniu jak odczynnik komercyjnie dostępny, jednak pozwalał na redukcję kosztów tego procesu.

Ostatnia oryginalna praca naukowa, oznaczona jako 2.3, miała na celu sekwencjonowanie genomów szczepów bakteryjnych wchodzących w skład konsorcjum Great Five, ich anotację, analizę pod względem obecności genów kodujących metabolity wtórne, w tym substancje mające potencjalnie rolę w ochronie bulw ziemniaka przed bakteriami pektynolitycznymi. Sekwencje genomów zostały również przeanalizowane pod kątem obecności genów kodujących szkodliwe dla człowieka białka lub syntezę innych toksycznych związków. Z punktu widzenia komercjalizacji, istotnym jest także określenie, czy w genomach szczepów, które potencjalnie miałyby być używane w produkcji rolniczej znajdują się geny oporności na antybiotyki i jaka jest lokalizacja tych genów. Czy Doktorant przeprowadził taką analizę?

Następną częścią pracy doktorskiej jest rozdział 3. **Discussion**, której główną częścią jest rozdział z książki wydanej przez wydawnictwo Springer w 2020. Rozdział ma charakter przeglądowy i opisuje wyniki światowych badań nad wykorzystaniem syntetycznych konsorcjów mikroorganizmów w biologicznej ochronie roślin i nie jest rozdziałem, który byłby *sensu stricto* dyskusją wyników uzyskanych przez Doktoranta. Teoretycznie odrębny rozdział poświęcony dyskusji uzyskanych wyników mógłby być pominięty, ponieważ w dwóch publikacjach taka dyskusja została umieszczona. Jednak bardziej ceniałabym rozdział zawierający rzetelną, niepozbawioną autokrytycyzmu ocenę własnych wyników w świetle innych prac naukowych. Chociaż doktorant wielokrotnie podkreśla wyższość zastosowania konsorcjum bakteryjnego nad preparatem bazującym na jednym szczepie, wyniki uzyskane w pracy 2.1 nie wskazują na to jednoznacznie. Skuteczność ochrony bulw ziemniaka przez konsorcjum jest podobna do tej uzyskanej przy zastosowaniu niektórych pojedynczych

szczepów. A jeżeli uzyskane wyniki miałyby mieć zastosowanie w praktyce, a konsorcjum szczepów wprowadzone na rynek jako środek ochrony roślin, koszty badań rejestracyjnych dla wszystkich szczepów konsorcjum byłyby bardzo wysokie i prawdopodobnie nieopłacalne.

Z punktu widzenia recenzenta, chociaż rozprawa zawiera bardzo wartościowe publikacje przedstawiające ciekawe wyniki, odczuwam brak części jasno określającej cele tej pracy i/lub hipotezy badawcze, a także części zawierającej wnioski wyciągnięte ze wszystkich badań w tym również wnioski ukierunkowujące dalsze badania naukowe lub prace rozwojowe.

Podsumowując, przedstawioną do recenzji pracę oceniam bardzo dobrze. Uważam, że rozprawa doktorska mgr. T. M. Maciąga stanowi dobrze zaplanowaną i zrealizowaną pracę badawczą. Z zamieszczonego w rozprawie *Curriculum Vitae* Doktoranta wynika, że aktywnie uczestniczy on w pracach naukowych zespołu i oprócz prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej jest on współautorem dodatkowych 5 publikacji naukowych, a wyniki prac prezentował na różnych międzynarodowych konferencjach. Wyniki pracy doktorskiej Pana mgr. Tomasza M. Maciąga zostały nie tylko opublikowane w prestiżowych czasopismach naukowych, ale stały się również podstawą trzech przyznanych patentów (patenty polskie i europejskie) oraz mają szansę na komercjalizację.

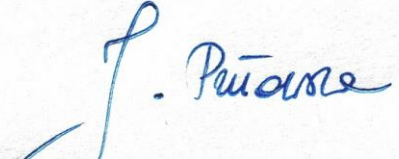
Konkludując, uważam, że przedstawiona do oceny praca odpowiada warunkom stawianym rozprawom doktorskim. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego w Gdańsku o dopuszczenie Pana mgr. Tomasza Mikołaja Maciąga do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej

Biorąc pod uwagę:

- wysoki poziom naukowy rozprawy oraz jej formę w postaci opublikowanych prac w bardzo dobrych międzynarodowych czasopismach;
- charakter prac obejmujący zarówno badania podstawowe jak i aplikacyjne;
- potencjał wdrożeniowy wyników i ich nowatorski charakter potwierdzony przyznaniem patentów,

wniosuję o wyróżnienie rozprawy, a jej Autora stosowną nagrodą.


Prof. dr hab. inż. Joanna Puławska