



Lublin, 27 września 2022

Dr hab. Marta Fiołka, prof. UMCS  
Katedra Immunobiologii  
Instytut Nauk Biologicznych  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie  
Tel. +48 815375050  
E-mail: [marta.fiolka@mail.umcs.pl](mailto:marta.fiolka@mail.umcs.pl)

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana magistra Tomasza Maciąga zatytułowanej „Syntetyczne konsorcjum bakterii chroniące rośliny ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) przed bakteriami pektynolitycznymi: od szalki Petriego do przechowalnictwa ziemniaków” wykonanej pod kierunkiem dra hab. Roberta Czajkowskiego, prof. UG w Zakładzie Badania Związków Biologicznie Czynnych na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii UG-GUMed Uniwersytetu Gdańskiego**

Choroby bakteryjne roślin powodują znaczne straty w rolnictwie stanowiąc duży problem. Stosowanie metod kontroli chemicznej to główny sposób zwalczania patogenów roślinnych na całym świecie. Jednak stosowanie pestycydów na szeroką skalę powoduje problemy ekologiczne. Środki ochrony roślin przedostają się do powietrza, zanieczyszczają glebę i zbiorniki wodne, oraz zostają zaabsorbowane przez organizmy, które nie miały podlegać opryskowi. Rosnąca odporność patogenów roślinnych wpływa na zwiększenie częstości występowania chorób roślin użytkowych. Badania wskazują również na związek pomiędzy ekspozycją na środki ochrony roślin, a zwiększoną zachorowalnością na wiele typów nowotworów oraz choroby neurodegeneracyjne, takie jak choroba Parkinsona i Alzheimer.

Alternatywą dla środków chemicznych jest kontrola biologiczna wykorzystująca zdolność mikroorganizmów do wzajemnego oddziaływania na siebie i ograniczania wzrostu. Pożyteczne bakterie mają zdolność do wytwarzania związków przeciwdrobnoustrojowych, przez co mogą

hamować rozwój patogenów roślinnych. Dlatego też, wykorzystanie mikroorganizmów to obiecująca droga do zapobiegania rozprzestrzeniania się patogenów roślin użytkowych, zmniejszenia strat ekonomicznych oraz ochrony zdrowia ludzi.

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska zatytułowana „Syntetyczne konsorcjum bakterii chroniące rośliny ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) przed bakteriami pektynolitycznymi: od szalki Petriego do przechowalnictwa ziemniaków” została przygotowana w języku angielskim i ma układ typowy dla prac doktorskich złożonych z cyklu artykułów naukowych. Rozprawa stanowi zestawienie trzech spójnych tematycznie publikacji, prac eksperymentalnych opublikowanych w latach 2019 – 2022 oraz pracy przeglądowej. Artykuły zostały opublikowane w czasopismach naukowych z listy Journal Citation Report (JCR): *Plant Disease*, *Applied Microbiology and Biotechnology (AMB)* i *Molecular Plant-Microbe Interactions (MPMI)* oraz rozdziale książki, *How Research Can Stimulate the Development of Commercial Biological Control Against Plant Diseases, Progress in Biological Control* (Springer, 2020).

Oceniana rozprawa doktorska składa się również z abstraktu w języku angielskim i polskim, wstępu w języku angielskim, celów pracy doktorskiej, życiorysu naukowego Doktoranta, rozdziału - prawa autorskie i pozwolenia oraz oświadczeń współautorów o wkładzie w powstanie artykułów w czasopismach i rozdziału w książce.

Tematyka rozprawy dotyczy poszukiwania alternatywnych do chemicznych metod ochrony roślin przed patogenami bakteryjnymi z wykorzystaniem biologicznej ochrony roślin. W szczególności badania skupiają się na znalezieniu pożytecznych mikroorganizmów, antagonistycznych do patogenów, mogących zastąpić w rolnictwie stosowanie środków chemicznych, szkodliwych dla ludzi, zwierząt i środowiska.

Na uwagę zasługuje bogato i bardzo dobrze opracowany wstęp napisany w języku angielskim, zawierający popularnonaukowe wprowadzenie, rozdziały dotyczące mikrobiologii gleby oraz biologicznej ochrony roślin. Ponadto opisane jest hiper Pasożytnictwo i drapieźnictwo, zakłócenie patogenezы oraz istotne choroby roślin. Rozdział w syntetyczny sposób przedstawia poszczególne zagadnienia. Materiał ten nadaje się do wykorzystania w pracy przeglądowej w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.



W publikacji **pierwszej** zatytułowanej „Compatible mixture of bacterial antagonists developed to protect potato tubers from soft rot caused by *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp” opublikowanej w czasopiśmie *Plant Disease*, scharakteryzowano możliwości ochrony bulw ziemniaka przed gniciem powodowanym przez bakterie z rodziny Soft Rot *Pectobacteriaceae* (SRP) w warunkach sprzyjających chorobie, przy użyciu kompatybilnych mieszanin antagonistów bakteryjnych. Opracowano protokół przesiewowy i oceniano dwadzieścia antagonistycznych szczepów bakteryjnych względem kombinacji pięciu szczepów *Pectobacterium* i *Dickeya* reprezentujących gatunki powodujące miękką zgniliznę ziemniaka w Europie. Te pięć szczepów (szczep *Serratia plymuthica* A294, *Enterobacter amnigenus* szczep A167, *Rahnella aquatilis* szczep H145, *Serratia rubidaea* szczep H440 i szczep *S. rubidaea* H469) połączono w celu wytworzenia syntetycznego konsorcjum do kontroli biologicznej przeciwko mokrej zgniliznie ziemniaka (ang. potato soft rot). Otrzymane syntetyczne konsorcjum, nazwane „Wielką Piątką”, zostało przetestowane na bulwach ziemniaka. Za pomocą tej kompozycji drobnoustrojów uzyskano ochronę zmniejszającą mokrą zgniliznę o 46%. Antagonistów scharakteryzowano pod kątem ważnych cech dla zastosowań komercyjnych (temperatura, oporność na antybiotyki i potencjalna toksyczność wobec *Caenorhabditis elegans*).

Po zapoznaniu się z tą pracą, chciałabym poprosić Pana magistra o przybliżenie w skrócie na czym polega innowacyjność metody przesiewowej do selekcji aktywnych antagonistów? Czym różni się ona od innych stosowanych metod?

W publikacji **drugiej** zatytułowanej „The Great Five - an artificial bacterial consortium with antagonistic activity towards *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp.: formulation, shelf life, and the ability to prevent soft rot of potato in storage” opublikowanej w czasopiśmie *Applied Microbiology and Biotechnology* autorzy wielokierunkowo charakteryzowali sztuczne konsorcjum bakteryjne nazwane „Wielką Piątką” opracowane w celu ochrony bulw ziemniaka przed mokrą zgnilizną wywołaną przez bakterie *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp. W celu zbadania potencjału komercjalizacyjnego opracowano preparaty: proszek i płyn, w skład których wchodziły te same szczepy (*S. plymuthica* szczep A294, *E. amnigenus* szczep A167,



*R. aquatilis* szczep H145, *S. rubidaea* szczep H440 i *S. rubidaea* szczep H469). Proszki uzyskiwano po liofilizacji, przy użyciu nowo opracowanego odczynnika do tego procesu. Okres przechowywania preparatów w temperaturze 8°C i 22°C był monitorowany przez 12 miesięcy. Najdłuższy okres trwałości uzyskano dla preparatów przechowywanych w 8°C. Jednakże żywotność wszystkich preparatów była skrócona w 22°C. Zdolność preparatów proszkowych do zachowania aktywności biokontrolnej konsorcjum została przetestowana na bulwach ziemniaka traktowanych preparatami oraz mieszaniną patogenów mokrej zgnilizny. Zaszczepione bulwy przechowywano przez 6 miesięcy w 8°C, aby naśladować handlowe warunki przechowywania. Nasilenie i częstość występowania mokrej zgnilizny na bulwach ziemniaka traktowanych preparatami były znacznie zmniejszone (do odpowiednio 62-75% i 48-61%) w porównaniu z kontrolą pozytywną z samymi patogenami. Nowo opracowana formuła „Wielkiej Piątki” może zapewnić dobrą trwałość ziemniaków przez co najmniej 1 rok, przy przechowywaniu w temperaturze 8°C, a zatem można ją wykorzystać do biokontroli mokrej zgnilizny.

Zaprezentowane badania mają istotny aspekt praktyczny, a opracowany wynalazek może znaleźć zastosowanie przyczyniając się istotnie do zmniejszenia strat spowodowanych mokrą zgnilizną ziemniaka. Chciałabym zapytać Pana magistra jak długo trwało opracowywanie „Wielkiej Piątki” i co przysporzyło najwięcej trudności?

W publikacji **trzeciej** pt. „Compatible mixture of bacterial antagonists developed to protect potato tubers from soft rot caused by *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp.” opublikowanej w *Molecular Plant-Microbe Interactions*, określono sekwencje genomu szczepów tworzących syntetyczne konsorcjum „Wielkiej Piątki.” Mogą one pomóc w identyfikacji cech istotnych dla aktywności biokontroli konsorcjum, interakcji między szczepami i kompatybilności szczepów. Nie zaleziono klastrów kodujących jakiegokolwiek wtórne metabolity toksyczne dla ludzi i zwierząt w uzyskanych genomach. Zidentyfikowano natomiast metabolity wtórne o znanej aktywności przeciwgrzybowej, takie jak pironitryna oraz o działaniu przeciwbakteryjnym, jak zeamina. Otrzymane wyniki mogą zatem pomóc w identyfikacji szerszego zastosowania dla konsorcjum „Wielkiej Piątki”, na przykład przeciwko ważnym grzybowym patogenom ziemniaka, takim jak *Rhizoctonia solani*. Ponadto sodorifen wytwarzany przez *S. plymuthica* jest uważany za



niezbędny do komunikacji międzygatunkowej przez związki lotne. Sekwencje genomu szczepów tworzących syntetyczne konsorcjum, ułatwią opracowanie i wykorzystanie podobnych kompozycji mikrobiologicznych do zastosowań rolniczych, umożliwią lepsze zrozumienie interakcji międzygatunkowych tej złożonej społeczności bakterii oraz doprowadzą do nowych zastosowań dla już zaprojektowanego konsorcjum.

Znany z literatury jest wpływ dżdżownic *Aporrectodea rosea* i *Aporrectodea trapezoides* na zahamowanie choroby siewek pszenicy spowodowanej *Rhizoctonia solani*. Może warto byłoby w przyszłości przyjrzeć się symbiontom tych bezkręgowców i zaprojektować konsorcjum w oparciu o mikroorganizmy wydalane do środowiska przez dżdżownice. Zdobyte doświadczenie i wiedza Doktoranta są niewątpliwie solidną bazą do rozwoju badań nad biologiczną kontrolą opartą o dobór odpowiednich mikroorganizmów.

W publikacji **czwartej** zatytułowanej „Biological Control Based on Microbial Consortia – From Theory to Commercial Products”, która stanowi obszerny rozdział opublikowany w książce pt. „How Research Can Stimulate the Development of Commercial Biological Control Against Plant Diseases, Progress in Biological Control” 21, wydawnictwa Springer Nature Switzerland, zwrócono uwagę, że kontrola biologiczna oparta o wykorzystanie konkretnych mikroorganizmów do zastosowania w rolnictwie i przemyśle ma rosnące znaczenie i coraz częściej stanowi przedmiot badań naukowców. Naturalne kompozycje mikrobiologiczne były stosowane jako kokultury od tysięcy lat do przechowywania żywności, a od niedawna do kompostowania, bioremediacji i oczyszczania ścieków. Kombinacje czynników biokontroli mają większy potencjał i powodują skuteczniejsze tłumienie wielu chorób roślinnych. Daje to efekt korzystniejszy niż stosowanie pojedynczych mikroorganizmów. Autorzy opisują, że wykazano przydatność syntetycznych mikrokonsorcjów w celu zwiększenia biologicznej aktywności przeciw patogenom rolnictwie. Dowiedziono, że połączenie kilku czynników biokontroli, posiadających różne mechanizmy działania może zapewnić skuteczną ochronę przed patogenami w różnych warunkach środowiskowych.

Autorzy zwracają uwagę, że istnieją różne protokoły opisujące dobór składników, które można wykorzystać do tworzenia mikrobiologicznych konsorcjów. Wybrane mikroorganizmy



powinny być niepatogenne dla ludzi, zwierząt i roślin. Ponadto powinny być odporne na niekorzystne warunki środowiskowe, działać synergistycznie i szybko, mieć długi okres przydatności do spożycia, być łatwe w produkcji i tanie. Obecnie w większości wykorzystuje się konsorcja zawierające dwa gatunki mikroorganizmów. Takie dualne konsorcja eksponowane są głównie w tych samych warunkach (temp. pH i dostępność składników odżywczych). Wprowadzenie sztucznych mikrokonsorcjów do ryzosfery może aktywować procesy naturalnie występujące w tych niszach jak np. wiązanie azotu, wytwarzanie związków przeciwdrobnoustrojowych, czy odporność na suszę, mróz lub nadmierną wilgotność. Opracowane są również kompozycje trzech lub czterech bakterii, które autorzy scharakteryzowali. Projektowanie sztucznych konsorcjów mikrobiologicznych jest trudne ze względu na złożoność interakcji między drobnoustrojami, roślinami i środowiskiem.

Autorzy ponadto przekonują, że poszerzenie wiedzy na temat korzystnego wpływu konsorcjów drobnoustrojowych na zdrowie i kondycję roślin umożliwia rozwój nowych bioproduktów dla rolnictwa, a postępy w mikrobiologii syntetycznej i inżynierii mikrobiologicznej umożliwiają rozwój prostych syntetycznych ekosystemów wzmacniających kondycję roślin i zwalczanie patogenów. Jednak w celu komercjalizacji tych rozwiązań niezbędna jest zmiana uregulowań prawnych, które nie nadążają za postępem w nauce.

Oceniana rozprawa doktorska ma udokumentowane wybitne osiągnięcia naukowe oraz aplikacyjne i dlatego wnoszę do wysokiej Rady Dyscypliny Nauki biologiczne UG o jej wyróżnienie. Wniosek mój uzasadniam tym, że zaprezentowane w rozprawie badania są nowe w skali światowej, mają poziom wynalazczy i nadają się do przemysłowego zastosowania. W rozprawie doktorskiej Pan mgr Tomasz Maciąg przeprowadził badania nad opracowaniem innowacyjnego syntetycznego konsorcjum szczepów bakterii antagonistycznych względem bakteryjnych patogenów roślin z rodzaju *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp., a także metody formulacji konsorcjum w celu jego późniejszego wykorzystania na bulwach ziemniaka w warunkach przechowywania. Doktorant jest pierwszym autorem w dwóch pracach (AMB i MPMI), równorzędnym pierwszym autorem w kolejnej pracy (Plant Disease) oraz drugim autorem w rozdziale książki, opublikowanej w wydawnictwie Springer.



Ponadto Pan mgr Tomasz Maciąg jest współtwórcą trzech wynalazków P.431434, EP3495510 (Biopreparations based on microorganisms for protection of plants against bacterial infections to be used in agriculture); P.423806, EP3495510 (Antagonistic bacterial strains, compositions thereof and use for plant protection; P. 428215, EP3670645 (Reagent for protection microorganisms during lyophilization), z których pierwsze dwa uzyskały ochronę patentową. Wynalazki zostały zgłoszone na ścieżce międzynarodowej, co świadczy o ogromie pracy włożonym w te zgłoszenia. Publikacje oraz opracowane wynalazki, opatentowane i zgłoszone do ochrony patentowej, to elementy świadczące o wyróżniającym charakterze rozprawy doktorskiej. Konsorcjum bakteryjne "Wielka Piątka" jest wynalazkiem, który pozwoli uchronić ziemniaki przed chorobą jaką jest mokra zgnilizna i zarazem uniknąć znacznych strat ekonomicznych. Trwałość przechowywania ziemniaków jest zagadnieniem bardzo ważnym, nie tylko dla producentów rolnych i sieci handlowych, ale również dla wielu gospodarstw domowych.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana mgra Tomasza Maciąga stanowi istotny wkład w badania z zakresu biologicznej ochrony roślin z wykorzystaniem syntetycznych konsorcjów mikroorganizmów. Praca charakteryzuje się wysokim poziomem naukowym i aplikacyjnym, a Doktorant wykazał się nowatorskim podejściem do opracowywanych zagadnień oraz rzetelnością w prowadzeniu badań i redagowaniu prac. Moim zdaniem, rozprawa doktorska Pana magistra Tomasza Maciąga w pełni spełnia warunki regulaminu wyróżniania rozpraw doktorskich przez Radę Dyscypliny Nauki biologiczne UG.

Uważam, że recenzowana rozprawa doktorska w pełni spełnia kryteria stawiane kandydatom w Ustawie - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020r poz.85 z późn. zm.) i dlatego też wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pana magistra Tomasza Maciąga do dalszych etapów obrony rozprawy doktorskiej.

Z poważaniem  
dr hab. Marta Fiołka, prof. UMCS

