

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Aleksandry Steglańskiej
pt. **"Opracowanie strategii zapobiegania rozwojowi fitopatogenów ziemniaka
sadzeniaka (*Solanum tuberosum* L.) w oparciu o ekologiczne rozwiązania
biotechnologiczne."**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Aleksandry Steglańskiej, wykonana została pod kierunkiem Pani profesor dr hab. Barbary Gutarowskiej i Pani prof. dr hab. inż. Doroty Kręgiel na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej w ramach Interdyscyplinarnej Szkoły Doktorskiej.

Zakres pracy obejmował 2 etapy badawcze:

1. Wskazanie markerów wczesnego porażenia ziemniaka sadzeniaka (w postaci lotnych związków organicznych) wydzielanych przez patogeny oraz przez zainfekowane sadzeniaki oraz określenie parametrów fizjologicznych wzrostu ziemniaka po infekcji patogenami.

2. **Opracowanie biopreparatów biologicznych do ochrony ziemniaka sadzeniaka przed rozwojem fitopatogenów zawierających 1) żywe komórki drożdży należące do kladu *Metschnikowia pulcherrima*, 2) żywe komórki bakterii kwasu mlekowego oraz 3) wodne ekstrakty roślinne.** W ramach tego etapu wykonano skryning szczepów drożdży (10), bakterii fermentacji mlekowej (100 szczepów), ekstraktów roślinnych (wodne i wodno-glikolowe z 22 roślin) pod kątem aktywności przeciw wybranym patogenom ziemniaka.

W przypadku drożdży *Metschnikowia pulcherrima* przeprowadzono szereg testów laboratoryjnych w kierunku

- tworzenia pulcherriminy (w głównej mierze odpowiedzialnej za zdolność tego gatunku drożdży do biokontroli innych drobnoustrojów),
- zdolności produkowania enzymów przez testowane drożdże oraz wykonano obszerne badania w kierunku wyboru optymalnej pożywki hodowlanej.

W przypadku testów *in vitro* dotyczących bakterii fermentacyjnych również

- dokonano wyboru pożywki w celu hodowli w skali mikro oraz
- oceniono zdolność bakterii do wytwarzania kwasów organicznych i etanolu.

Badania w zakresie opracowania trzeciego biopreparatu zawierającego ekstrakty roślinne obejmowały analizę składu chemicznego za pomocą GC-MS (chromatografia gazowa ze spektrometrią mas).

Dla wszystkich opracowywanych biopreparatów wykonano także testy *in vivo* określające skuteczność izolatów drożdży, szczepów bakterii oraz wyciągów roślinnych przeciw *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Pectobacterium carotovorum*, *Alternaria tenuissima*, *Fusarium sambucinum*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum coccodes*, *Phoma exigua*, *Streptomyces scabiei*.

Niezmiernie istotnym aspektem tej rozprawy jest także ocena wpływu opracowanych biopreparatów na 1) obniżenie zanieczyszczenia ziemniaka sadzeniaka metabolitami fitopatogennych grzybów oraz na 2) wzrost i aktywność fizjologiczną ziemniaka sadzeniaka po zastosowaniu tychże biopreparatów. Testy te zostały zrealizowane w laboratorium (za pomocą LC-MS/MS chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas) oraz w testach szklarniowych (*in situ*), odpowiednio.

Całość zaplanowanych i zrealizowanych badań obejmowały badania mikrobiologiczne, chemiczne i testy szklarniowe. Są to bardzo spójne działania i klarownie opisane oraz sprawnie wykonane. Należy szczególnie podkreślić, że wszystkie omówione zagadnienia stanowią całość świetnie zrealizowanego projektu badawczego (nr 00010.DDD.6509.00016.2018.05 finansowanego przez ARiMR). Przedłożona rozprawa jest wzorcowym przykładem zaplanowania etapów badań i dobrze przemyślanego zrealizowania kompleksowych i kompatybilnych ze sobą testów dostarczających wyników, które ostatecznie pozwoliły na zrealizowanie przyjętych założeń dotyczących opracowania strategii ochrony sadzeniaka ziemniaka. Oczywiście należy pamiętać, że wszystkie przedstawione w rozprawie badania wynikiem pracy zespołowej, ale dołączone oświadczenia współautorów bezwzględnie wskazują na wiodącą rolę doktorantki. Dodatkowo tak kompleksowe badania obejmujące różne aspekty realizowane były w ramach współpracującego ze sobą zespołu badawczego, co jest dodatkowym atutem tej rozprawy. Jest to także dowodem na umiejętność Doktorantki współpracy w zespole.

Rozprawę stanowi kompilacja pięciu spójnych tematycznie artykułów, cztery z nich opublikowano w roku 2022, a piąty w roku 2023. Dwa artykuły są opublikowane w *Molecules*, natomiast kolejne po jednym w *Agronomy*, *Applied Sciences* i w *International Journal of Environmental Research and Public Health*. Wszystkie są pracami oryginalnymi prezentującymi wyniki otrzymane przez Doktorantkę w ramach pracy zespołowej. Sumaryczny współczynnik oddziaływania tych prac (Impact Factor; IF) wynosi 21,255, łączna liczba punktów MEiN to 620 pkt. Do dysertacji dołączono także oświadczenia współautorów o udziale w publikacjach, co zostało jeszcze dodatkowo opracowane w postaci tabel wskazujących udział merytoryczny autorów w każdej z publikacji. Procentowy udział Doktorantki we wszystkich pracach kształtuje się w zakresie 60-65%.

W świetle przedstawionych danych, zestawienie tych prac tak, aby tworzyły rozprawę dokorską nie budzi moich wątpliwości. Prace stanowiące rozprawę, przed opublikowaniem w periodykach naukowych, podlegały wnikliwej i rygorystycznej recenzji (peer-review) specjalistów i edytorów naukowych i uzyskały ich pozytywne opinie. Nie widzę zatem konieczności omawiania strony edytorskiej tych prac w dalszej części mojej oceny.

W skład rozprawy wchodzi

- krótkie Streszczenie w języku polskim i angielskim,
- wykaz zastosowanych skrótów,
- wykaz publikacji wchodzących w skład dysertacji oraz
- omówienie osiągnięć badawczych, które poprzedzone jest genezą i celem pracy, zakresem pracy i przedstawieniem hipotez badawczych oraz omówieniem metod badawczych. Całość opracowania (36 stron) zakończona jest wnioskami (9), które kompatybilnie odzwierciedlają postawione hipotezy badawcze. Całość kończy się podsumowaniem oraz wykazem literatury.

Geneza prezentująca uzasadnienia podjęcie tej tematyki badań w krótki sposób zawiera informacje o produkcji ziemniaka, przechowywania sadzeniaków oraz o głównych patogenach – Doktorantka wymienia mikroorganizmy, które wywołują choroby bulw z grupy grzybów i bakterii. Są to w większości obiekty, które były przedmiotem badań, w tej grupie wymieniony został także obiekt kwarantannowy

(*Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus*). Niestety w tym wykazie patogenów pominięto drugi ważny patogen, także kwarantannowy- *Ralstonia solanacearum* (aczkolwiek Doktorantka wspomina o nim w publikacji nr 4). W dalszej części tekstu zawarto informację, że zarówno w przypadku drożdży *M. pulcherrima*, bakterii kwasu mlekowego jak i wykorzystania ekstraktów roślinnych z łatwo dostępnych w Polsce roślin, brakuje szeroko zakrojonych badań oceniających ich przydatność do ochrony ziemniaków sadzeniaków. Stanowi to uzasadnienie podjęcia badań ukierunkowanych na opracowanie trzech biopreparatów opartych na wymienionych substancjach i mikroorganizmach. W związku z tym brak jest wyników pozwalających określić efekt stosowania wytypowanych mikroorganizmów pożytecznych na wzrost i rozwój ziemniaków sadzeniaków po zakończonym okresie przechowalniczym. Nie prowadzono także dotąd badań oceniających wpływ opracowanych biopreparatów na profil wytwarzanych przez fitopatogenne grzyby mikotoksyn, (Autorka zamiast fitopatogenne grzyby używa sformułowanie „pleśnie”, co uważam jest trochę niefortunne).

Za bardzo interesującą część badawczą rozprawy uważam **wyznaczenie markerów (lotne związki organiczne) wczesnego porażenia ziemniaka sadzeniaka wybranymi fitopatogenami oraz zaproponowano parametry fizjologiczne *S. tuberosum* L.**, które można uznać za najbardziej przydatne wskaźniki świadczące o porażeniu bulw (publikacja nr 1). Publikacja nr 1 zawiera także informację o stosowaniu, podczas testów szklarniowych, środka ochrony roślin o nazwie handlowej Limocide, który m.in miał chronić rośliny przed stonką ziemniaczaną. Przyznam, że przeczytałam to z zaskoczeniem, więc w tym miejscu poproszę o trochę więcej informacji. W publikacji nr 2. przedstawiono wyniki poszczególnych etapów badań prowadzących do opracowania pożywki serwatkowej do hodowli wytypowanych do biopreparatu żywych komórek drożdży *M. pulcherrima* TK1. W tym miejscu należy podkreślić wartościowy wniosek wynikający z badań Autorki, że izolaty środowiskowe Metschnikowia spp. były bardziej aktywne niż szczepy kolekcyjne. Badania wykazały także, że aktywność antydrobnoustrojowa związana jest głównie z obecnością żywych komórek drożdży, a mniej z ich pozakomórkowymi metabolitami. Kolejna publikacja (nr 3) dotyczy drugiego preparatu zawierającego bakterie kwasu mlekowego. Przeprowadzono screening 100 szczepów

bakterii kwasu mlekowego. Na podstawie uzyskanych wyników wytypowano szczep *L. plantarum* KB2 LAB 03 o najlepszej aktywności, dla którego opracowano także pożywkę serwatkową do produkcji w skali mikro. Badania zmierzające do opracowania trzeciego biopreparatu na bazie ekstraktów roślinnych zawarto w publikacji nr 4. Dokonano identyfikacji profilu lotnych związków najbardziej aktywnych ekstraktów roślinnych i na podstawie testów *in vivo* wskazano wodny ekstrakt z czosnku jako najlepszy wariant biopreparatu roślinnego dla ochrony ziemniaka sadzeniaka.

Podsumowując ten etap badań należy uznać, że Doktorantka wytypowała najbardziej aktywne szczepy drożdży *M. pulcherrima* TK1 i bakterii *L. plantarum* KB2 LAB 03 oraz wodny ekstrakt z czosnku do opracowywanych biopreparatów i opracowała pożywki hodowlane z odpowiednią suplementacją. Jest to wartościowe dokonanie, jednakże nie mogę się zgodzić, że można to nazwać strategią zapobiegania rozwojowi patogenów sadzeniaka. Autorka zaproponowała preparaty do stosowania, ale nie opracowała strategii ich stosowania, która powinna opisywać terminy stosowania, konieczne do spełnienia warunki (np. liczba zabiegów oraz metody aplikowania, konieczne powtórzenia, warunki termiczne podczas aplikacji). Zatem poproszę Doktorantkę o zaproponowanie takiej strategii ochrony sadzeniaka w oparciu o jeden, dwa a może trzy biopreparaty stosowane samodzielnie lub może łącznie i wskazanie warunków granicznych dla uzyskania najbardziej pożądaných efektów ochrony sadzeniaków.

W piątej publikacji składającej się na dysertację oceniono wpływ biopreparatów na obniżenie zanieczyszczenia ziemniaków sadzeniaków mykotoksynami oraz stan fizjologiczny ziemniaków sadzeniaków (Doktorantka posługuje się zapisem „mikotoksyny”, osobiście użyłabym formę „mykotoksyny”). Na podstawie przeprowadzonych badań nie uzyskano jednoznacznego potwierdzenia możliwości ograniczenia wszystkich produkowanych przez patogeny mykotoksyn, a jedynie (a może „aż”) została ograniczona zawartość **niektórych** mykotoksyn i fitotoksyn. Druga część badań tej pracy polegała na ocenie wpływu opracowanych biopreparatów na wzrost i aktywność fizjologiczną wysadzanych sadzeniaków. Aplikacja biopreparatów z drożdży i bakterii pozwoliła całkowicie wyeliminować, a w przypadku ekstraktu z

czosnku znacząco zmniejszyć, niekorzystny wpływ patogenów na parametry stanu fizjologicznego roślin - wzrost korzeni oraz wypełnienie korzeniami profilu glebowego.

Wszystkie opracowane biopreparaty do ochrony sadzeniaków przed patogenami zostały zgłoszone do ochrony patentowej, co również stanowi dodatkową wartość prezentowanych badań.

Załączony krótki wykaz literatury obejmuje 45 pozycji, w tym pięć pozycji to polskojęzyczne. Jednak z zaskoczeniem zauważyłam, że w zamieszczonym wykazie literatury nie znalazły się źródła, na które Doktorantka powołuje się na stronie 21 (tabela zawierająca przykładowe czynniki biokontroli patogenów ziemniaka, zawiera ona jedynie dwie przytoczone w wykazie literatury pozycje).

W podsumowaniu chcę stwierdzić, że przedstawione badania reprezentują bardzo interesujący obszar badawczy będący odpowiedzią na potrzebę ochrony roślin z wykorzystaniem produktów mikrobiologicznych oraz naturalnych, z pominięciem środków chemicznych.

Na zakończenie, chciałabym poprosić Doktorantkę o wyjaśnienie, dlaczego testy *in situ* dotyczące właściwości przeciwdrobnoustrojowych z wykorzystaniem opracowanych preparatów wykonywała w temperaturze 25°C. Należy mieć na uwadze, że nie jest to temperatura przechowywania sadzeniaków, zdaję sobie także sprawę, że temp. 25°C była prawdopodobnie czynnikiem stymulującym wzrost i rozwój inokulowanych patogenów. Tym niemniej należy pamiętać, że temperatura jest jednym z ważniejszych czynników determinujących skuteczność mikroorganizmów. W warunkach przechowalniczych i w trakcie dłuższego czasu przechowywania sadzeniaków opracowane preparaty mikrobiologiczne mogą inaczej oddziaływać na patogeny sadzeniaków, co szczególnie może mieć miejsce w przypadku wykorzystania drożdży oraz wpływać na ich przeżycie po aplikacji. Chciałabym także zapytać, dlaczego każdy patogen był reprezentowany w badaniach tylko przez jeden izolat/szczep. Mam świadomość obszerności prowadzonych badań, tym niemniej zróżnicowana podatność różnych szczepów tego samego gatunku patogenu może zmieniać interakcje z np. zastosowanymi biologicznymi czynnikami kontroli i może być czynnikiem decydującym o niepowodzeniu wykonanych zabiegów ochronnych. Należy to uwzględnić, aby opracować strategię minimalizującą takie ryzyko. Zmienna podatność różnych szczepów patogenów determinuje skuteczność preparatów

mikrobiologicznych, a czasem i produktów roślinnych. Poproszę także o informację, w jakim sektorze ochrony roślin i praktycznego wykorzystania biologicznych środków ochrony roślin szczególne znaczenie ma szczep danego gatunku/czynnika biokontroli.

Na podstawie załączonego do dysertacji życiorysu naukowego można stwierdzić, że zaangażowanie Doktorantki w pracę naukową znalazło swoje odzwierciedlenie w odbytych stażach naukowych oraz w udziale w realizowanych projektach (3). Doktorantka została także doceniona przez środowisko akademickie, które przyznało Jej stypendia naukowe (w latach 2019-2023). Otrzymała także Nagrody za działalność publikacyjną (w tym za publikacje będące częścią tej dysertacji) oraz wyróżnienie za referat na Sesji Młodych Mikrobiologów - co świadczy o umiejętności prezentowania swoich wyników na forum publicznym.

Na zakończenie chciałabym jeszcze wspomnieć, że Doktorantka przygotowała bardzo starannie przedłożoną rozprawę - merytorycznie, a szczególnie pod względem edytorskim. Na uwagę i uznanie zasługuje także sprawne i szybkie zestawienie uzyskanych wyników i ich upowszechnienie (całość publikacji wchodzących w skład dysertacji opublikowano w latach 2022-2023).

Uważam, że oceniana rozprawa spełnia warunki wymagane Ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.) i popieram wniosek o nadanie stopnia doktora nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia mgr inż. Aleksandrze Steglańskiej

Prof. dr hab. Jolanta Kowalska

Poznań, 01.07.2023 r.

