

Kraków, 15 marca 2024 r.

Prof. dr hab. Katarzyna Turnau  
Instytut Nauk o Środowisku,  
Wydział Biologii Uniwersytetu  
Jagiellońskiego w Krakowie

**Rada Dyscypliny Biotechnologia**  
**Uniwersytetu Gdańskiego**  
Biuro Dziekana Międzyuczelnianego  
Wydziału Biotechnologii UG i GUMed  
ul. Abrahama 58, 80-307 Gdańsk

**Recenzja osiągnięć naukowych dr Doroty M. Krzyżanowskiej w związku z wnioskiem o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie biotechnologia**

Dr Dorota Krzyżanowska jest absolwentką Uniwersytetu Gdańskiego i swoją karierę naukową w całości związała z tym uniwersytetem. Tytuł doktora uzyskała w 2015 roku na podstawie rozprawy doktorskiej „Antagonizm szczepu *Pseudomonas* P482 względem bakteryjnych patogenów roślin z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya* w warunkach *in vitro* i *in planta*”. Po ukończeniu Studium Doktoranckiego w zakresie Chemii i Biochemii (przy Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego) została zatrudniona jako pracownik badawczy (główny wykonawca) w projekcie NCN OPUS7, następnie od 2018 roku jako post-doc (adiunkt) w projekcie NCN OPUS 13, w obu przypadkach w Zakładzie Mikrobiologii Roślin. Od 2022 roku przeszła na stanowisko typu *lab manager* w projekcie NCN SONATA BIS w Zakładzie Badania Związków Biologicznie Czynnych w Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii UG i GUMed.

Na podstawie przedstawionej dokumentacji stwierdzam, że Habilitantka spełnia wstępne wymogi art. 219 ust. 1 pkt. 1 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”, posiadając stopień doktora.

**Ocena osiągnięcia naukowego**

Jako osiągnięcie, zgodnie z art. 219 ust. 1 pkt 2 Ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z dn. 30 sierpnia 2018 r, habilitantka wskazała cykl czterech publikacji naukowych wspólnie zatytułowanych „Wykorzystanie sekwencjonowania następnej generacji oraz metod



analizy *in silico* do poznania właściwości wybranych ryzobakterii o potencjale do zastosowania w biologicznej ochronie roślin”. Prace te zostały opublikowane w czasopiśmie indeksowanym w Web of Science oraz ujęte są w wykazie MNiSW. Są to czasopisma o dobrej renomie. We wszystkich pracach habilitantka jest autorem pierwszym, a jej wkład jest dominujący. Osiągnięcie spełnia warunek spójności tematycznej, a elementem łączącym jest wykorzystanie metod opartych na sekwencjonowaniu następnej generacji (NGS). Osobiście uważam, że obecnie w mikrobiologii metody molekularne to jest już standard i za bardziej odpowiednie uważałabym scalenie osiągnięcia przykładowo pod tytułem „biologia wybranych bakterii PGPR i ich interakcje z bakteriami SRP (Soft Rot Pectobacteriaceae)”; ewentualnie w podtytule dodałabym zastosowanie NGS. Przypuszczalnie powodem takiego sformułowania były przyczyny bardziej organizacyjne (np. ominięcie podobnego tytułu u innych pracowników zespołu).

Moim zdaniem Habilitantka przygotowała autoreferat wzorowo i precyzyjnie (z zaznaczeniem wszelkich powiązań pracy z innymi publikacjami np. nie wchodzącymi w zakres osiągnięcia) i w sposób niezwykle przyjazny recenzentowi. W zasadzie po przeczytaniu autoreferatu miałam nie tylko pełny obraz sytuacji, ale także czytałam go z dużym zainteresowaniem. Wyjątkowe było załączenie schematów/ilustracji. Szkoda, że Pani dr Krzyżanowska nie jest dydaktykiem, bo zapewne sprawdziłaby się znakomicie w tej roli. Zdecydowanie Pani dr Krzyżanowska ma talent popularyzatorski.

Do badań opisanych w ramach osiągnięcia wybrano dwa szczepy bakterii *Ochrobactrum quorumnogens* A44 i *Pseudomonas donghuensis* P482, pochodzące z ryzosfery roślin użytkowych z rodziny *Solanaceae*: szczep *O. quorumnogens* A44 z ryzosfery ziemniaka i szczep *P. donghuensis* P482 z ryzosfery pomidora. Szczepy tych bakterii są przydatne w biologicznej ochronie roślin przed chorobami powodowanymi przez bakterie pektynolityczne *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp. Zagadnienie jest ważne nie tylko z punktu widzenia poznawczego a przede wszystkim praktycznego, ponieważ SRP powodują mokrą zgniliznę roślin użytkowych prowadząc do istotnych ekonomicznie strat (szczególnie w uprawach ziemniaka).

Pierwsze dwie prace dotyczą szczepu *Ochrobactrum* A44, której pozycja taksonomiczna nie była poprzednio jasna. Uzyskano dla tego szczepu oraz szczepów pokrewnych sekwencje genomowe, a także porównano te szczepy stosując analizy biochemiczne. Autorzy zaproponowali wyodrębnienie nowego gatunku *Ochrobactrum quorumnogens* ze wskazaniem szczepu A44T jako szczepu typowego. Kompletną sekwencję genomu A44T uzyskano



poprzez hybrydowe składanie danych z Illumina HiSeq2500 i PacBio RS. Dla pozostałych szczepów otrzymano sekwencje w formie draftów. Uzyskane wyniki pozwoliły na przeprowadzenie porównawczej analizy genomów bakterii z rodzaju *Ochrobactrum*. Do tej analizy dołączono następnie charakterystykę profili estrów metylowych kwasów tłuszczowych oraz profili białkowych, cech morfologicznych, biochemicznych, także obejmujących analizy dotyczące zdolności szczepów do produkcji ureazy co może mieć dodatkowo znaczenie z punktu widzenia praktyki. Pomimo obecności operonu ureazy w genomach bakterii tej grupy aktywność ureazy wykazano tylko u jednego z badanych gatunków, co wiązało się prawdopodobnie ze zróżnicowaniem strukturalnym odcinków DNA i ich pochodzeniem. Szczepy ureazo-dodatnie są bardziej przystosowane do siedlisk o niższych wartościach pH, mogą skorzystać także z mocznika jako źródła azotu, ale także pozyskują zdolność biomineralizacji, co obecnie budzi duże zainteresowanie. Ciekawe są także analizy wykazujące podłoże genetyczne ruchliwości szczepów z rodzaju *Ochrobactrum*. Habilitantka przy wsparciu pozostałych autorów wykazała obecność delekcji odcinka DNA związanego z tworzeniem rzęsek w genomie *O. thiophenivorans*. Cenne są także wstępne badania dotyczące zdolności badanych szczepów *Ochrobactrum* spp. do inaktywacji cząsteczek sygnałowych typu AHL. W kolejnej pracy Habilitantka podjęła się analizy ekspresji genów *O. quorumnocens*. Ograniczeniem w takiej sytuacji jest zwykle wybór genów referencyjnych, a następnie zastosowanie RT-qPCR do pomiaru zmian poziomu ekspresji genu *aiiO* u szczepu A44 w odpowiedzi na AHL oraz inne czynniki środowiskowe (faza wzrostu, temperatura, pH, dodatek ekstraktu z korzeni ziemniaka). Wybór genów referencyjnych poprzedzono szeregiem testów, co uwiarygadnia przeprowadzone badania. Wykonane badania otwierają nowe możliwości badawcze, które zapewne wkrótce zaowocują kolejnymi pracami.

Kolejne dwie prace dotyczą *Pseudomonas donghuensis*, zaliczane do grupy PGPR, które budzą obecnie uzasadnione zainteresowanie ze względu na możliwość użycia ich w biopreparatach, jako organizmy stosowane w ochronie roślin przed patogenami.

Za główny cel Habilitantka wybrała pozyskanie kompletnej sekwencji genomu szczepu *P. donghuensis* P482 oraz określenie potencjału tego szczepu P482 do produkcji metabolitów wtórnych, a w szczególności obecności w genomie receptorów odpowiedzialnych za pozyskiwanie żelaza, zagadnienie kluczowe jeżeli chodzi o konkurencję mikroorganizmów w ryzosferze i decydujące o uzyskaniu przewagi nad patogenami. Dodatkowo ustalono obecność profaga należącego do rzędu Caudovirales i rodziny Siphoviridae. Perspektywa badań dotyczących tego zagadnienia jest obiecująca.



Celem ostatniej publikacji wchodzącej w osiągnięcie było wytypowanie szlaków metabolicznych zaangażowanych w przystosowanie *Pseudomonas* do interakcji z różnymi gospodarzami roślinnymi. Jako gospodarzy wybrano pomidora i kukurydzę, a więc gospodarzy odległych taksonomicznie. Analizowano odpowiedź szczepu *P. donghuensis* P482 na wydzieliny z korzeni wybranych roślin. Odpowiedź transkryptomyczna bakterii na związki wydzielone przez pomidora była szersza niż odpowiedź na związki z kukurydzy. Analizy pozwoliły na interpretację danych związanych ze szlakami metabolicznymi. Przeprowadzono także analizę chemiczną składu obu typów eksudatów przy użyciu GC-MS, NMR i chromatografii cieczowej, aby powiązać obecność niektórych podstawowych metabolitów z odpowiedzią transkryptomyczną P482. Odpowiedź wspólna dla obu typów eksudatów obejmuje geny związane z asymilacją siarki, metabolizmem arsenu, pozyskiwaniem żelaza z ksenosideroforów i związków hemu, homeostazą żelaza i regulacją systemu sekrecyjnego T6SS. W przypadku eksudatów pomidora reakcja wskazuje na objawy stresu spowodowanego tworzeniem tlenkiem azotu. Habilitantka bardzo dokładnie i z dużą pewnością przedstawia uzyskane wyniki różniące działania obu eksudatów roślinnych na ekspresję genów bakterii. W moim mniemaniu doskonale radzi sobie z formułowaniem celów, przeprowadzeniem analiz, interpretacją wyników i wyciąganiem wniosków odnośnie dalszych badań. Autoreferat doskonale przedstawia wszystkie te elementy i pozostawia nas w przekonaniu o dojrzałości badaczki procesów zachodzących w interakcjach roślina - mikroorganizmy. Jestem pod wrażeniem przeprowadzonych badań, ale jak w każdej tego typu pracy trafiają się drobne niedociągnięcia, choć z terminami czasem pojawiają się problemy natury lokalnej. Osobiście nie jestem zwolenniczką stosowania dla bakterii terminu mikroflora, dziś raczej preferujemy słowo mikrobiota oraz nie wydaje mi się zasadne zastąpienie słowa rzęska przez wić. W tym drugim przypadku mamy do czynienia z układem mikrotubul, a w przypadku rzęsek są to struktury jednolite, białkowe. Podobne problemy pojawiają się w licznych podręcznikach, co naturalnie tłumaczy ich użycie przez Habilitantkę.

### **Ocena innych osiągnięć naukowych**

Habilitantka jest obecnie pracownikiem naukowo-badawczym w Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii UG i GUMed w Gdańsku. Dodatkowo posiada doświadczenia administracyjno-organizacyjne, co uważam za bardzo cenne. Ma także udział w dydaktyce poprzez przygotowanie skryptu dla studentów oraz opiekę nad studentami. Brała udział w przygotowaniu rozdziału do książki wydanego przez Springer. Poza pracami wchodzącymi w zakres osiągnięcia, jest współautorem 12 innych publikacji, które ukazały się w bardzo dobrych lub dobrych czasopismach, takich jak Scientific Reports, Journal of Microbiological



Methods czy Molecular Plant-Microbial Interactions. Habilitantka brała udział w licznych konferencjach przy czym jednak rzadko wygłaszała sama referaty (po doktoracie tylko raz). Była współautorem wielu prezentacji posterowych (około 50, przy czym po doktoracie 30). Była wykonawcą w szeregu projektach, jednak samodzielnie, poza pełnieniem funkcji kierownika projektu wewnątrz-uczelnianego, nie uzyskała finansowania, co nie pozwoliło na stworzenie własnej grupy. To zapewne będzie konieczne na dalszym etapie kariery. Habilitantka odbyła szereg staży zagranicznych od miesiąca do trzech w Hiszpanii, Holandii (2 razy po 3 miesiące) i kilkudniowy w Izraelu. Recenzowała także prace innych badaczy dla czasopism zagranicznych.

Na szczególne podkreślenie zasługuje udział w dwóch patentach krajowych i jednym europejskim. Habilitantka skutecznie popularyzuje informacje o prowadzonych badaniach, co już zaowocowało zainteresowaniem firmy zajmującej się użyciem mikroorganizmów w biopreparatach. To właściwa aktywność dla przyszłości zarówno uczelni jak i gospodarki.

#### Konkluzja

Podsumowując, stwierdzam, że osiągnięcia naukowe Dr Doroty M. Krzyżanowskiej spełniają wymogi stawiane w Ustawie „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z dn. 30 sierpnia 2018r. Pozytywnie opiniuję wniosek Dr Doroty M. Krzyżanowskiej o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biotechnologia.

*Katarzyna Turvan*