



AUTOREFERAT

przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych

*Opracowanie metod wykrywania, identyfikacji i badania
bioróżnorodności bakteryjnych patogenów roślin oraz wykorzystanie
zimnej plazmy do ich eradykacji*

Wojciech Śledź

1. Imię i nazwisko.

Wojciech Śledź

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2002, Doktor nauk biologicznych w zakresie biochemii, Uniwersytet Gdański, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego), Gdańsk
Rozprawa doktorska pt. „*Wykrywanie, identyfikacja i badanie zróżnicowania genetycznego polskiej kolekcji bakterii Erwinia carotovora subsp. atroseptica (Pectobacterium carotovorum subsp. atrosepticum)*”.

Promotor: Prof. dr hab. Ewa Łojkowska

Recenzenci: Prof. dr hab. Adam Jaworski oraz Prof. dr hab. Piotr Sobiczewski

Rozprawa doktorska obroniona z wyróżnieniem

1992, Magister inżynier w zakresie rolnictwa, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie (obecnie Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie), Olsztyn,
Praca magisterska pt.: „Wpływ herbicydów Bladex 50WP i Stomp 330EC na przebieg mitozy wybranych odmian bobiku *Vicia faba minor* L.”

Promotor: dr inż. Anna Samborska-Ciania

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

2020 – obecnie nauczyciel akademicki w grupie pracowników badawczo-dydaktycznych zatrudniony na stanowisku adiunkta. Uniwersytet Gdański, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin

2004 – obecnie wicedyrektor Instytutu Biotechnologii Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

1994 - 2020 nauczyciel akademicki w grupie pracowników badawczo-dydaktycznych zatrudniony na stanowisku asystenta, Uniwersytet Gdański, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Katedra Biotechnologii, Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

Tytuł osiągnięcia naukowego: ***Opracowanie metod wykrywania, identyfikacji i badania bioróżnorodności bakteryjnych patogenów roślin oraz wykorzystanie zimnej plazmy do ich eradykacji***

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

[H1] Śledz W., Adamowska A., Piosik J., Łojkowska E. 2012. Detecting live and dead cells of *Pectobacterium atrosepticum* based on immunomagnetism separation and staining. *Journal of Plant Pathology* 94(3):681-685 (doi:10.4454/JPP.FA.2012.050)

IF^a = 2,643

IF^b₂₀₁₂ = 0,688

MEiN^c = 40

MEiN^d₂₀₁₂ = 20

LC^e (WoS) = 2

LC^e (GS) = 1

Mój wkład w powstanie pracy polegał na stworzeniu koncepcji testu, zaprojektowaniu doświadczeń i przeprowadzeniu części doświadczeń, merytorycznym i praktycznym nadzorowaniu części doświadczeń, analizie statystycznej wyników i przygotowaniu graficznej części manuskryptu, interpretacji i częściowej dyskusji wyników, sformułowaniu wniosków, przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu artykułu, odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz poprawie zrecenzowanego manuskryptu

[H2] Potrykus[&] M., Śledz[&]W., Golanowska M., Sławiak M., Binek A., Motyka A., Zoledowska S., Czajkowski R., Łojkowska E. 2014. Simultaneous detection of major blackleg and soft rot bacterial pathogens in potato by multiplex polymerase chain reaction. *Annals of Applied Biology* 165(3) 474-487 (doi:10.1111/aab.12156)

IF^a = 2,766

IF^b₂₀₁₄ = 2,00

MEiN^c = 100
MEiN^d₂₀₁₄ = 40
LC^e (WoS) = 41
LC^e (GS) = 72

&równy udział współautorów

Mój wkład w powstanie pracy polegał na stworzeniu koncepcji testu, zaprojektowaniu i przeprowadzeniu części doświadczeń, merytorycznym i praktycznym nadzorowaniem części doświadczeń, zaplanowaniu metodyki badań, opracowaniu wyników udziale w przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu i w dyskusji nad ostateczną treścią manuskryptu.

[H3] Motyka A., Zoledowska S., **Śledz W.**, Lojkowska E. 2017. Molecular methods as tools to control plant diseases caused by *Dickeya and Pectobacterium spp.*: a minireview. *New Biotechnology* 39 181-189 (doi:10.1016/j.nbt.2017.08.010)

IF^a = 6,49
IF^b₂₀₁₇ = 3,733
MEiN^c = 100
MEiN^d₂₀₁₇ = 100
LC^e (WoS) = 33
LC^e (GS) = 53

Mój wkład w powstanie pracy polegał na merytorycznym wsparciu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu, obejmował także udział w korekcie i w dyskusji nad ostateczną treścią manuskryptu.

[H4] Zoledowska S., Motyka A., Zukowska D., **Śledz W.**, Lojkowska, E. 2018. Population structure and biodiversity of *Pectobacterium parmentieri* isolated from potato fields in temperate climate. *Plant Disease* 102(1), 154-164 (doi:10.1094/PDIS-05-17-0761-RE)

IF^a = 4,614
IF^b₂₀₁₈ = 3,583
MEiN^c = 70
MEiN^d₂₀₁₈ = 70
LC^e (WoS) = 29
LC^e (GS) = 38

Mój wkład w powstanie pracy polegał współtworzeniu koncepcji pracy, udziale w przeprowadzeniu eksperymentów, na merytorycznym wsparciu w pracy nad wstępną i ostateczną wersją manuskryptu, udziale w korekcie i w dyskusji treści zawartych w manuskrypcie.

[H5] Motyka-Pomagruk, A., Zoledowska, S., **Śledz, W.**, Lojkowska, E. 2021. The occurrence of bacteria from different species of *Pectobacteriaceae* on seed potato plantations in Poland. *European Journal of Plant Pathology* 159(2), 309-325 (doi: 10.1007/s10658-020-02163-x)

IF^a = 2,224
IF^b₂₀₂₁ = 2,224
MEiN^c = 100
MEiN^d₂₀₂₁ = 100
LC^e (WoS) = 13
LC^e (GS) = 18

Mój wkład w powstanie pracy polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, udziale w przeprowadzeniu eksperymentów, merytorycznym wsparciu przygotowania manuskryptu, udziale w korekcie i w dyskusji treści zawartych w manuskrypcie.

[H6] Sledz *W., Motyka-Pomagruk A., Zukowska D., Babinska-Wensierska W., Zoledowska S., Lojkowska E. 2023. Genotypic and phenotypic uniformity among the population of *Pectobacterium atrosepticum* strains isolated during three growing seasons from potato fields in Poland. *European Journal of Plant Pathology*. Opublikowano online 13.05.2023. (doi.org/10.1007/s10658-023-02687-y)

IF^a = 2,224

IF^b₂₀₂₃ = 2,224

MEiN^c = 100

MEiN^d₂₀₂₃ = 100

LC^e (WoS) = 0

LC^e (GS) = 0

*** autor do korespondencji**

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na zaprojektowaniu części doświadczeń i ich wykonaniu, przygotowaniu części wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu, udziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz poprawie zrecenzowanego manuskryptu

[H7] Sledz*W., Los E., Paczek A., Rischka J., Motyka A., Zoledowska S., Piosik J., Lojkowska E. 2015. Antibacterial activity of caffeine against plant pathogenic bacteria. *Acta Biochimica Polonica* 62(3) 605-612 (doi:10.18388/abp.2015_1092)

IF^a = 2,349

IF^b₂₀₁₅ = 1,187

MEiN^c = 70

MEiN^d₂₀₁₅ = 40

LC^e (WoS) = 30

LC^e (GS) = 52

*** autor do korespondencji**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy, zaprojektowaniu doświadczeń i przeprowadzeniu części prac eksperymentalnych, nadzorowaniu wykonywania doświadczeń, analizie statystycznej wyników i przygotowaniu merytorycznej i graficznej części manuskryptu, interpretacji i dyskusji wyników, sformułowaniu wniosków, udziale w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu artykułu, odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz poprawie zrecenzowanego manuskryptu.

[H8] Motyka A., Dzimitrowicz A., Jamroz P., Lojkowska E., Sledz W.&, Pohl P.&. 2018. Rapid eradication of bacterial phytopathogens by atmospheric pressure glow discharge generated in contact with a flowing liquid cathode. *Biotechnology and Bioengineering* 116(6) (1581-1593, doi:10.1002/bit.26565)

IF^a = 4,395

IF^b₂₀₁₈ = 4,26

MEiN^c = 100

MEiN^d₂₀₁₈ = 100

LC^e (WoS) = 11

LC^e (GS) = 17

& równy udział współautorów

Mój wkład w powstanie pracy polegał na współtworzeniu koncepcji badań, zaprojektowaniu i wykonaniu części eksperymentów biologicznych, udziale w korekcie i w dyskusji części treści zawartych w manuskrypcie.

[H9] Dzimitrowicz A., Motyka-Pomagruk A., Cyganowski P., Babinska W., Terefinko D., Jamroz P., Lojkowska E., Pohl P.&, Sledz, W*&. 2018. Antibacterial activity of fructose-stabilized silver nanoparticles produced by direct current atmospheric pressure glow discharge towards quarantine pests. *Nanomaterials* 8(10), 751 (doi:10.3390/nano8100751)

IF^a = 5,719

IF^b₂₀₁₈ = 4,039

MEiN^c = 100

MEiN^d₂₀₁₈ = 70

LC^e (WoS) = 21

LC^e (GS) = 32

& równy udział współautorów

*** autor do korespondencji**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, zaprojektowaniu i wykonaniu części eksperymentów biologicznych, udziale w interpretacji i dyskusji wyników, częściowym przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu artykułu, przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz poprawie zrecenzowanego manuskryptu.

IF^a) aktualny współczynnik Impact Factor Stan na 29.08.2023

IF^b) - Impact Factor dla roku opublikowania pracy

MEiN^c aktualna punktacja wg. MEiN. Stan na 29.08.2023

MEiN^d punktacja wg. MEiN. dla roku opublikowania pracy

LC^e liczba cytowań wg. Web of Science (WoS)/Google Scholar GS)

Omówienie celu naukowego i osiągniętych wyników

Wstęp

Perspektywy bezpieczeństwa żywnościowego na świecie nie są optymistyczne. Liczebność populacji ludzkiej stale rośnie, a znacząca ilość produktów rolno-spożywczych jest tracona w efekcie strat powodowanych przez bakteryjne patogeny roślin. Warto podkreślić, że wspomniane straty odnotowuje się zarówno w trakcie wegetacji jak i transportu czy przechowywania płodów rolnych. Dane literaturowe sugerują, że z powodu chorób bakteryjnych, grzybowych i wirusowych traconych jest około 40% plonów (Ellis i Boehm, 2009). W tym kontekście monitoring występowania drobnoustrojów chorobotwórczych względem roślin, poznanie ścieżek ich rozprzestrzeniania, szczegółowe opisanie ich bioróżnorodności oraz zaproponowanie innowacyjnych, efektywnych metod zwalczania wspomnianych mikroorganizmów nabiera szczególnie istotnego znaczenia. Podjęcie tej tematyki badawczej może w przyszłości przyczynić się do ograniczenia niedoborów żywieniowych na świecie.

W swojej pracy badawczej skupiłem się przede wszystkim na bakteriach pektynolitycznych z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium*, czynnikach etiologicznych chorób zwanych: czarną nóżką i mokrą zgnilizną, infekujących różne rośliny uprawne, warzywnicze czy ozdobne, a zwłaszcza rośliny ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.).

Polska zajmuje wysoką, siódmą pozycję wśród największych producentów ziemniaka na świecie (FAO, 2012). Szacuje się, że na terenie naszego kraju 2,2 mln rolników,

zaangażowanych w uprawę ziemniaka, wykorzystuje w tym celu ok. 10% całkowitego areалу uprawnego. Ziemniak zajmuje również ważne miejsce w międzynarodowych programach mających na celu zapewnienie bezpieczeństwa żywnościowego na świecie, jak i likwidacji głodu oraz niedożywienia (International Potato Center, Research for Development). Dlatego bulwy ziemniaka są czasem określane „warzywem przyszłości”, chociaż już teraz ich światowa produkcja ustępuje jedynie zbiorom kukurydzy, ryżu i pszenicy (FAO, 2012). Pomimo, że opisano jak dotąd co najmniej 160 jednostek chorobowych ziemniaka, Mansfield i in. (2012) ujęli w zestawieniu 10 najistotniejszych ekonomicznie bakteryjnych patogenów roślin bakterie pektynolityczne z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium*, będące czynnikami etiologicznymi czarnej nóżki i mokrej zgnilizny. Warto podkreślić, że straty ekonomiczne w uprawach ziemniaka związane z występowaniem tych jednostek chorobowych nie są jednakowe w różnych krajach. Na przykład w Holandii dyskwalifikacja materiału sadzeniakowego, z powodu objawów czarnej nóżki, powoduje straty wysokości ok. 30 milionów euro rocznie (Toth i in., 2011). Bakterie pektynolityczne z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium* to patogeny o szerokim zakresie gospodarza, powodujące objawy chorobowe na roślinach okrytozalążkowych należących do 50% rzędów (Ma i in., 2007). Symptomy czarnej nóżki na ziemniaku zaobserwować można w warunkach polowych w trakcie wegetacji roślin, natomiast mokra zgnilizna jest odnotowywana zarówno w warunkach polowych, jak i w trakcie transportu czy przechowywania bulw. Charakterystyczne objawy czarnej nóżki ziemniaka obejmują więdnienie liści, czernienie podstawy pędu, brak bulw potomnych, a w skrajnych przypadkach brak wschodów roślin. Za bezpośrednie przyczyny tych objawów przyjmuje się: macerację tkanki roślinnej przez bakteryjne enzymy pektynolityczne oraz zatykanie naczyń przewodzących rośliny w wyniku produkcji przez patogena egzopolisacharydów. Natomiast w przypadku mokrej zgnilizny ziemniaka charakterystyczna jest postępująca maceracja miąższu bulw, wynikająca z aktywności pektynolitycznej, celulolitycznej i proteolitycznej enzymów wytwarzanych i wydzielanych przez bakterie z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium*.

W kontekście mojej dotychczasowej pracy badawczej niezwykle istotną kwestią jest fakt, że ochrona roślin przed bakteriami z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium* obejmują przede wszystkim metody profilaktyczne (Czajkowski i in., 2011). Żadne efektywnie działające środki ochrony roślin, chemiczne bądź biologiczne, nie zostały

dotychczas wdrożone do produkcji ziemniaka. Również hodowla odmian ziemniaka o zwiększonej odporności na te czynniki chorobotwórcze nie okazała się skuteczna. Dodatkowo, hodowla i uprawa roślin genetycznie modyfikowanych odpornych na fitopatogeny spotyka się ze sprzeciwem społeczeństwa w większości krajów europejskich, w tym na terenie Polski.

W efekcie ochrona roślin przed bakteriami pektynolitycznymi oparta jest przede wszystkim na stosowaniu zdrowego, certyfikowanego materiału sadzeniakowego, unikaniu kontaminacji bakteriami poprzez używanie sprzętu agrotechnicznego poddanego sanityzacji oraz prowadzenie zbioru przy optymalnych warunkach pogodowych. Równocześnie kluczowego znaczenia nabiera monitorowanie występowania patogenów i poznanie ich dróg rozprzestrzeniania. Warto podkreślić, że bakterie z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium* spp. nie wywołują objawów infekcji w niekorzystnych dla rozwoju procesu chorobowego warunkach środowiskowych; często mamy zatem do czynienia z infekcjami latentnymi, które mogą być źródłem rozprzestrzeniania się infekcji. Biorąc pod uwagę międzynarodowy charakter rynku sadzeniakowego, fitopatogeny mogą być przenoszone na duże odległości, co w konsekwencji prowadzi do efektywnego rozprzestrzenienia się tzw. „chorób odbakteryjnych”.

Aby zaproponować nowe, skuteczne metody ochrony roślin przed bakteryjnymi fitopatogenami należy pozyskać jak najwięcej informacji dotyczących danego czynnika chorobotwórczego. Bakterie pektynolityczne z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium* to ruchliwe Gram(-) pałeczki o peritrichalnym ułożeniu rzęsek. Są fakultatywnymi anaerobami, niezdolnymi do tworzenia spor. U niektórych szczepów *Dickeya* i *Pectobacterium* spp. odnotowano występowanie fimbrii i hemaglutynin o średnicy ok. 7-10 nm (Christofi i in., 1979; Wallace i Pérombelon, 1992). Średnia wielkość komórki *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* wynosi $0,5-0,7 \times 1,2-2,2 \mu\text{m}$ (Ni i in., 2010), natomiast dane literaturowe donoszą, że komórki *Dickeya* spp. osiągają wielkość $1,5-3,6 \times 0,6-1,1 \mu\text{m}$ (Rungnapha i in., 2008). Wymienione bakterie klasyfikowane są obecnie do rodziny *Pectobacteriaceae*, wyodrębnionej z rodziny *Enterobacteriaceae*. Pierwsze doniesienia o tych drobnoustrojach zostały opublikowane w roku 1926 i opisano je jako przynależne do gatunku *Bacillus carotovorus* (Lacey, 1926). Następnie, bakterie te przyporządkowano do rodzaju *Erwinia*, wyróżniając gatunki: *Erwinia carotovora* lub *Erwinia chrysanthemi* (Burkholder i in., 1953). W roku 1998

reklasyfikowano te pektynolityczne fitopatogeny z rodzaju *Erwinia* do nowo wyodrębnionego rodzaju *Pectobacterium*, odpowiednio jako gatunki *Pectobacterium carotovorum* lub *Pectobacterium chrysanthemi* (Hauben i in., 1998). Obecnie w obrębie rodzaju *Pectobacterium* sklasyfikowane są 22 gatunki tj. *Pectobacterium aquaticum* (Pédron i in., 2019), *Pectobacterium aroidearum* (Nabhan i in., 2013), *Pectobacterium atrosepticum* (Gardan i in., 2003), *Pectobacterium betavascularum* (Gardan i in., 2003), *Pectobacterium cacticida* (Hauben i in., 1998), *Pectobacterium colocasium* (Klair i in., 2022), *Pectobacterium fontis* (Oulghazi i in., 2019), *Pectobacterium jejuense* (Hong i in., 2023), *Pectobacterium parmentieri* (Khayati i in., 2016b), *Pectobacterium parvum* (Pasanen i in., 2020), *Pectobacterium peruvienne* (Waleron i in., 2018b), *Pectobacterium polaris* (Dees i in., 2017b), *Pectobacterium polonicum* (Waleron i in., 2019), *Pectobacterium punjabense* (Sarfraz i in., 2018), *Pectobacterium quasiahquaticum* (Moussa i in., 2021), *Pectobacterium versatile* (Portier i in. 2019), *Pectobacterium wasabiae* (Gardan i in., 2003), *Pectobacterium zantedeschiae* (Waleron i in., 2018a), *Pectobacterium actinidiae*, *Pectobacterium brasiliense*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium odoriferum*, (Gallois i in. 1992, Gardan i in. 2003, Koh i in. 2012, Nabhan i in. 2012, Portier i in. 2019, Skerman i in. 1980).

Natomiast bakterie z gatunku *P. chrysanthemi* reklasyfikowano do rodzaju *Dickeya*, honorującego swoją nazwą amerykańskiego fitopatologa Roberta S. Dickeya. W efekcie, wszystkie szczepy należące w roku 2005 do gatunku *P. chrysanthemi* znalazły się w nowo wyodrębnionym rodzaju *Dickeya* (Samson i in., 2005). Obecnie wyróżnia się 13 gatunków w obrębie rodzaju *Dickeya* a mianowicie *Dickeya aquatica* (Parkinson i in., 2014), *Dickeya chrysanthemi* (Samson i in., 2005), *Dickeya colocasiae* (Boluk i in., 2022), *Dickeya dadantii* (obejmujący *D. dadantii* subsp. *dadantii* i *D. dadantii* subsp. *dieffenbachiae* (Brady i in., 2012; Samson i in., 2005), *Dickeya dianthicola* (Samson i in., 2005), *Dickeya fangzhongdai* (Tian i in., 2016), *Dickeya lacustris* (Hugouvieux-Cotte-Pattat i in., 2019), *Dickeya oryzae* (Wang i in. 2020), *Dickeya parazeae* (Hugouvieux-Cotte-Pattat i in., 2021), *Dickeya poaceiphila* (Hugouvieux-Cotte-Pattat i in., 2020), *Dickeya solani* (van der Wolf i in., 2014) oraz *Dickeya undicola* (Oulghazi i in., 2019) i *Dickeya zaeae* (Samson i in., 2005). W roku 2021 gatunek *Dickeya paradisiaca* (Samson i in., 2005) został reklasyfikowany do

nowo utworzonego rodzaju *Musicola gen. nov.* (Hugouvieux-Cotte-Pattat i in., 2020), obejmującego dwa gatunki *Musicola paradisiaca* oraz *Musicola keenii*.

Bakterie z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium* określa się mianem pektynolitycznych ze względu na ich zdolność do rozkładu pektyn, składnika ściany komórkowej roślin. System sekrecyjny typu II, w odpowiedzi na czynniki środowiskowe takie jak: obecność produktów degradacji pektyn, ograniczony dostęp do tlenu, zmiany w pH, temperaturze, osmolarności, dostępności jonów żelaza czy brak złożonych związków azotu, pozwala na aktywne wydzielanie całej gamy czynników wirulencji (Robert-Baudouy i in., 2000). Kluczowe znaczenie w procesie patogenezy mają enzymy zaangażowane w rozkład pektyn i zmetylowanego w różnym stopniu kwasu poligalakturonowego - metyloesterazy, acetyloesterazy, endoliazy i egzoliazy pektyn i kwasu poligalakturonowego oraz egzopoligalakturonazy. Przyjmuje się, że największy udział w degradacji tkanki roślinnej mają endoliazy kwasu poligalakturonowego i pektyn rozkładające te związki do oligomerów wykorzystywanych przez bakterie jako źródło węgla (Fagard i in., 2007). Bakterie z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium* posiadają ponadto efektywny system pozyskiwania jonów żelaza ze środowiska, jak i mechanizm detoksykacji wolnych rodników produkowanych przez rośliny w odpowiedzi na obecność fitopatogena. Niebagatelne znaczenie, w szczególności w pierwszych etapach infekcji, ma ruchliwość bakterii i ich zdolność do tworzenia zwartego biofilmu.

Występowanie bakterii z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium* na ziemniaku, który jest w centrum mojego naukowego zainteresowania, stwierdzono w wielu krajach, leżących w różnych strefach klimatycznych i na różnych kontynentach. Tsrer i in. oszacowali procent występowania objawów powodowanych przez bakterie z rodzaju *Dickeya* w Izraelu na 10% (Tsrer i in., 2009). W Finlandii Degefu i in. (2013) określili, iż w roku 2006 aż 37% prób roślin pobranych z pól ziemniaka wykazywało obecność bakterii z rodzaju *Dickeya*. W 2008 roku Pitman i in. opisali *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* jako dominujący gatunek bakterii pektynolitycznych powodujący straty ziemniaka w Nowej Zelandii. Natomiast w Chile to *P. atrosepticum* było najczęściej identyfikowanym gatunkiem bakterii pektynolitycznych w certyfikowanym materiale sadzeniakowym ziemniaka (Acuña i Riffo, 1993). Na terenie Polski bakterie pektynolityczne są ważnym problemem ekonomicznym. Zespół Zakładu Ochrony i Biotechnologii Roślin Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed w

którym prowadzę swoją działalność naukową zajmuje się od wielu lat badaniami w zakresie monitorowania pól ziemniaka i wód powierzchniowych pod kątem występowania bakterii pektynolitycznych (Śledź i in., 2000; Sławiak i in., 2009; Potrykus i in., 2015; Żołędowska i in. 2018; Motyka-Pomagruk i in. 2021).

Ważnym aspektem mojej pracy badawczej jest także badanie dróg rozprzestrzeniania się bakterii pektynolitycznych. Czarna nóżka i mokra zgnilizna są uważane za choroby przenoszone przez materiał sadzeniakowy. Należy jednak podkreślić, że źródłem bakterii z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium* spp. oprócz latentnie porażonych bulw matecznych zwanych sadzeniakami, mogą być wody powierzchniowe, aerosole czy wektory biologiczne takie jak np. owady czy nicienie. Bakterie mogą wnikać do tkanek roślin lub bulw przez naturalnie występujące otwory (szparki i przetchlinki) lub przez uszkodzenia mechaniczne (Huang, 1986).

Działalność człowieka przyczynia się w dużym stopniu do rozprzestrzeniania tych drobnoustrojów. Jest to związane nie tylko z międzynarodowymi sieciami powiązań w handlu ziemniakami sadzeniakami, ale także z efektami lokalnej infiltracji mikroorganizmów przez uszkodzenia mechaniczne powodowane przez maszyny rolnicze (zwłaszcza kombajny do zbioru bulw ziemniaka), ale także występowanie tych drobnoustrojów na uprawach może być skutkiem „przenoszenia” bakterii przez ludzi czy zwierzęta (van der Wolf i Kastelein, 2014).

Występowanie bakterii pektynolitycznych stwierdzono w ściekach, rowach melioracyjnych, strumieniach, rzekach i jeziorach na terenach wyżynnych i ornych, co ciekawe nie uzyskano jak dotąd izolatów tych mikroorganizmów pochodzących z wód podziemnych. Nawet deszczówka, śnieg i woda morska okazały się nie być wolne od tych fitopatogenów (McCarter-Zorner i in., 1984). Nawiązując do przeżywalności w glebie, przyjmuje się, że patogeny te nie są zdolne do prezimowania w glebie pozbawionej resztek roślinnych oraz, że wykazują się wyższą żywotnością w glebie wilgotnej niż w suchej (J. van der Waals, doniesienie ustne EUPHRESCO Workshop, Gdańsk 2015). Bakterie te mogą jednak zimować na pozostałościach tkanek roślinnych jako saprofity (Czajkowski i in., 2011). Fitopatogeny z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium* mogą być także przenoszone przez wektory, którymi mogą być owady i nicienie. Już w latach 20. XX wieku Leach (1926, 1931, 1933) odkryła, że owady z gatunku *Delia platura* mogą być wektorami bakterii z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium*. Molina i in. (1974) donieśli, że *Drosophila melanogaster* przenosi *P.*

atrosepticum na zdrowe rośliny ziemniaka w warunkach szklarniowych. Szczególnie interesujący jest przypadek owada *Acyrtosiphon pisum*, który według doniesień Gernier i in. (2006) miał być nie tylko wektorem *D. dadantii* 3937, ale także jego alternatywnym żywicielem. Udowodniono również możliwość przenoszenia *Dickeya* i *Pectobacterium* spp. przez nicienie *Caenorhabditis elegans* (Nykyri i in., 2014) oraz przez ślimaki (Ma i in., 2007).

Podsumowując bakterie pektynolityczne z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium* należą do ważnych patogenów roślin uprawnych, w tym ziemniaka oraz szeregu roślin warzywniczych i ozdobnych. Powodują każdego roku istotne, sięgające od 5 do 40 % straty w plonach. Trzeba także wziąć pod uwagę, iż choroby powodowane przez te bakterie mogą w przyszłości być jeszcze większym zagrożeniem dla upraw roślin użytkowych w Europie. Przewiduje się, że ocieplający się klimat będzie sprzyjał rozprzestrzenianiu się bakteryjnych patogenów. Drugim powodem mogą być drastyczne ograniczenia w stosowaniu pestycydów. W 2022 r. Komisja Europejska zaproponowała regulacje (projekt trafił w roku 2022 pod obrady Rady Państw Członkowskich oraz Parlamentu), w którym planuje się do 2030 r. ograniczenie o 50% stosowania niektórych pestycydów, a także całkowity zakaz ich używania na tzw. obszarach "wrażliwych". Równocześnie zakłada się, iż od roku 2035 będzie obowiązywał całkowity zakaz stosowania syntetycznych środków ochrony roślin. Obecnie Komisja Ochrony Środowiska Naturalnego Parlamentu Europejskiego (ENVI), pracuje nad projektem, który zakłada poprawkę we wcześniejszym projekcie i redukcję stosowania niektórych pestycydów z 50% do 80% do 2030 r. Obowiązkowe krajowe cele redukcji pestycydów i zakaz ich stosowania na tzw. obszarach wrażliwych, które w opinii przedstawicieli krajów członkowskich zostały w powyższym projekcie określone w taki sposób, iż stanowią one niekiedy 100% obszarów rolniczych danego państwa powoduje, że stosowanie pestycydów będzie w Europie znacząco ograniczone po roku 2035. Z przytoczonych powyżej danych wynika jak ważne jest monitorowanie występowania i rozprzestrzeniania się bakteryjnych patogenów w środowisku, opracowanie nowych metod szybkiej i skutecznej identyfikacji patogenów oraz innowacyjnych i przyjaznych środowisku skutecznych środków ochrony roślin.

Cel badań

Głównym celem moich badań, które doprowadziły do uzyskania przedstawionych we wniosku osiągnięć naukowych było podjęcie trzech bardzo istotnych tematów badawczych związanych z ochroną roślin uprawnych (głównie ziemniaka sadzeniaka) przed bakteriami pektynolitycznymi obejmujących:

- opracowanie metod wykrywania, identyfikacji oraz badania ścieżek rozprzestrzeniania pektynolitycznych patogenów bakteryjnych,
- scharakteryzowanie bioróżnorodności bakterii pektynolitycznych z wybranych gatunków sklasyfikowanych w obrębie rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium*,
- opracowanie innowacyjnych metod kontroli fitopatogenów bakteryjnych.

Dlatego też niniejszą prezentację podzieliłem na trzy części, zgodne ze wskazanymi powyżej tematami, w których przedstawię szczegółowe cele prowadzonych badań i ich wyniki składające się na uzyskane osiągnięcia.

Omówienie szczegółowych celów i wyników prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

Opracowanie metod wykrywania, identyfikacji oraz badania ścieżek rozprzestrzeniania pektynolitycznych patogenów bakteryjnych.

W badaniach nad patogenami roślin bardzo istotne są narzędzia, którymi posługuje się badacz, aby zdiagnozować czynniki chorobotwórcze w szybki i jednoznaczny sposób. Istnieje wiele metod i technik wykrywania oraz identyfikacji bakteryjnych patogenów wykorzystujących m.in. metody immunologiczne oparte na przeciwciałach i molekularne oparte na wykrywaniu określonych sekwencji DNA lub RNA. Techniki te mają jednakże zarówno ograniczenia jak i zalety. Dlatego też ciągle poszukuje się nowych rozwiązań pomocnych w diagnostyce fitopatogenów bakteryjnych. W tej części przedstawiam wyniki badań prowadzące do opracowania metod identyfikacji i wykrywania bakterii pektynolitycznych z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium*.

Omówienie pracy: I. Detecting live and dead cells of *Pectobacterium atrosepticum* based on immunomagnetics separation and staining

Celem pracy było opracowanie testu do wykrywania oraz identyfikacji żywych i martwych komórek bakteryjnych patogenów roślin z gatunku *P. atrosepticum* (Pba) w tkance bulw ziemniaka. Założeniem testu było połączenie immunomagnetycznej

separacji (IMS) komórek bakterii z ich selektywnym barwieniem zestawem LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability (Invitrogen, USA). Opisany poniżej test nazwałem IMS/LD. LIVE/DEAD BacLight™ Viability Kit zawiera barwnik Syto9 (wykazujący zieloną fluorescencję z maksimum wzbudzenia przy długości światła około 480 nm i maksymalną emisją przy 500 nm) oraz jodek propidyny (PI) (wykazujący czerwoną fluorescencję z maksimum wzbudzenia przy długości światła 490 nm i maksimum emisji przy 635 nm). Syto9 ma wiele właściwości, które czynią go przydatnym do tzw. „etykietowania” (barwienia) m.in. żywych komórek bakteryjnych, w tym wysoką zdolność do przenikania przez błony komórkowe, niską cytotoksyczność i wzmocnioną fluorescencję po wnikięciu w struktury DNA. Natomiast barwnik PI wnika tylko do komórek martwych z uszkodzonymi błonami i barwi DNA oraz RNA w wyniku interkalacji do ich cząsteczek (Monis i in., 2005). Należy podkreślić, iż PI ma mocniejsze powinowactwo niż Syto9 do kwasów nukleinowych, więc gdy oba barwniki wnikają do komórki (co jest możliwe tylko w przypadku martwych komórek z uszkodzonymi błonami), Syto9 jest „wpierane” ze struktur kwasów nukleinowych przez PI. Do metody IMS zastosowaliśmy dwa rodzaje kulek magnetycznych: Epoxy M-450 i M-280 (Dynabeads; Invitrogen, USA) oraz przeciwciała monoklonalne dla najliczniej reprezentowanej serogrupy I Pba (Pba Z-Eca04A-01, Prime Diagnostics PRI Wageningen, Holandia).

Wyniki badań: Najlepsze połączenie i separację oraz wykrywanie komórek Pba z kulkami Epoxy M-450 osiągnięto, gdy kulki były w pierwszym etapie powlekane 5,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ białka A (Sigma, USA). Opłaszczenie kulek Epoxy M-450 monoklonalnymi przeciwciałami (Pba Z-Eca04A-01) było najskuteczniejsze, gdy przeciwciała IgG były stosowane w stężeniu 6,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$, a proces przebiegał w temperaturze 22°C. Stwierdziliśmy, iż zastosowanie BSA o stężeniu 0,1% było niezbędne do wiązania IgG z antygenem ściany komórkowej. Separację komórek bakteryjnych prowadzono przez zastosowanie systemu separacji kulek Dynal Magnetics (Mikser Dynal MX4; Invitrogen, USA). Barwienie bakterii, wymienionymi wcześniej barwnikami, przeprowadzono, gdy komórki pozostawały związane z kulkami M-450. Optymalne stężenie barwników określono na 8,35 μM dla Syto9 i 0,1 mM dla PI. Te same warunki były optymalne do przygotowania kulek M-280, jednak nie było konieczne stosowanie proteiny A w celu lepszego przyłączenia przeciwciał do powierzchni mikrokulek. Tak opłaszczone mikrokulki Epoxy M-450 lub M-280 (przy końcowym stężeniu 2×10^6

mikrokulek ml^{-1}) stosowano do separacji bakterii Pba z zainfekowanego materiału roślinnego. Podczas barwienia próby inkubowano w ciemności przez 20 min w temperaturze pokojowej. Próby te były nanoszone na standardowe diagnostyczne szkiełka mikroskopowe i obserwowane przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego (ECLIPSE TE2000, Nikon z system filtrów: filtr G-2A, EX 510-560 nm, DM 575, BA 590 nm; filtr B-2A, EX450-490 nm, DM 505, BA 520 nm, system laserowy 488–515 nm) (Fig.1).

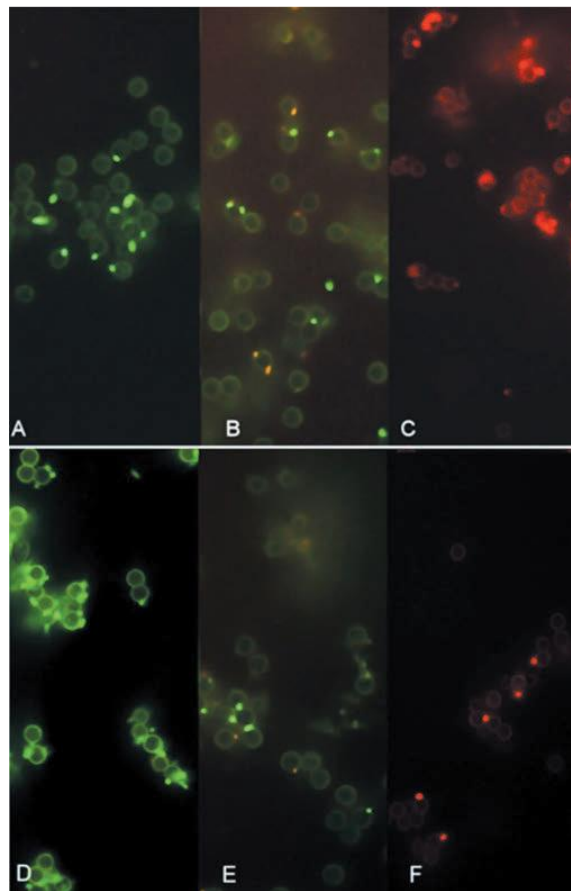


Fig. 1. Izolacja i wykrywanie żywych i martwych komórek *Pectobacterium atrosepticum* (Eca SCRI 1043) w homogenacie tkanki ziemniaka (skórki) przez separację immunomagnetyczną i barwienie IMS/LD.

Bakterie ekstrahowano z homogenatu za pomocą 2×10^6 kulek M-280 ml^{-1} (A, B, C) oraz 2×10^6 kulek M-450 ml^{-1} (D, E, F); kulki opłaszczono przeciwciałami anti-Pca ($6 \mu\text{g ml}^{-1}$). A, D: żywe komórki; B, E: mieszanina żywych i martwych komórek w stosunku 1:1; C, F: martwe komórki. Zielona fluorescencja wskazuje na żywe komórki (wzbudzenie przy długości światła 480 nm i emisja przy 500 nm); B, D, F: czerwona fluorescencja wskazuje na martwe komórki (wzbudzenie przy długości światła 490 nm i emisja przy 635 nm).

Poziom wykrywalności testu IMS/LD względem identyfikacji komórek bakterii Pba określono w homogenizowanej tkance ziemniaka. Próg wykrywania Pba w teście IMS/LD wynosił 10^5 jtk/ml próby z kulkami M-280 i 10^4 jtk/ml próby z kulkami Epoxy M-450.

Podsumowanie osiągnięcia: Efektem przeprowadzonych badań było opracowanie testu dedykowanego do izolacji i wykrywania żywych i martwych komórek Pba w tkance bulw ziemniaka. Poziomy wykrywalności w teście IMS/LD są podobne do tych uzyskanych metodą ELISA z tymi samymi przeciwciałami (van der Wolf i in., 1996). Dodatkową zaletą testu IMS/LD jest czas jego wykonania. Wyniki można uzyskać w ciągu 1 godziny (przy użyciu wcześniej przygotowanych opłaszczonych kulek magnetycznych).

Komentarz do osiągnięcia: Założeniem przy pracy nad IMS/LB było zaproponowanie testu wspomagającego inne metody identyfikacji bakterii Pba w „trudnych” próbach środowiskowych, w których np. obecność inhibitorów reakcji PCR nie pozwala na uzyskanie jednoznacznych wyników. Poza tym test ten jest użyteczny w przypadku, gdy chcemy w krótkim czasie uzyskać informację czy dany materiał roślinny jest porażony żywymi komórkami bakterii Pba czy obecne są w nim tylko komórki martwe, co jest istotne przy przewidywaniu ewentualnych strat w plonach.

Omówienie pracy: II. Simultaneous detection of major blackleg and soft rot bacterial pathogens in potato by multiplex polymerase chain reaction

Głównym celem przedstawianych badań było opracowanie szybkiego laboratoryjnego testu, przydatnego do wykrywania i identyfikacji patogennych bakterii pektynolitycznych, które wywołują na ziemniaku na terenie Polski i Europy choroby zwane czarną nóżką i mokrą zgnilizną. Do tej grupy należały bakterie z gatunków: *Pectobacterium atrosepticum* (Pba), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) (obecnie *Pectobacterium carotovorum*) razem z *Pectobacterium wasabiae* (Pwa) i *Dickeya* spp. (Dsp). Założyłem, iż test powinien umożliwiać wykrycie w/w bakterii równolegle (w jednej próbie) i będzie opierał się na tzw. łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Do opracowania testu multipleks PCR zastosowano wcześniej opisane specyficzne startery Df i Dr do wykrywania bakterii Dsp (Laurila i in., 2010), startery Y45 i Y46 do wykrywania bakterii Pba (Frechon i in., 1998) oraz startery ExpccF i ExpccR do wykrywania Pcc (wraz z Pwa) (Kang i in., 2003). Przeprowadzono badania polegające na optymalizacji składu mieszaniny amplifikacyjnej oraz warunków prowadzenia reakcji amplifikacji celem uzyskania specyficznych produktów DNA dla trzech zastosowanych par starterów w jednej reakcji multipleks PCR. Specyficzność testu multipleks PCR potwierdzono w badaniach na 71 szczepach bakteryjnych, w tym

48 należących do rodzajów *Pectobacterium* lub *Dickeya*. 23 szczepy reprezentowały inne gatunki, które mogą być potencjalnie obecne w tym samym środowisku w którym uprawia się ziemniaka. Czułość łańcuchowej reakcji polimerazy (multipleks PCR) oznaczano dla czystych kultur bakteryjnych oraz w materiale roślinnym (homogenacie). W próbach środowiskowych, pobranych z bulw ziemniaka może być obecny więcej niż jeden gatunek bakterii pektynolitycznych. **Opracowany test umożliwia wykrycie i identyfikację bakterii z trzech wymienionych gatunków występujących w postaci infekcji pojedynczych lub mieszanych.**

Wyniki badań: Do procedury badawczej opracowano także specjalistyczny autorski protokół izolacji DNA bakteryjnego z homogenatu łodygi i bulwy ziemniaka. Opracowana procedura umożliwia pozbycie się związków (m.in. kwasów humusowych i skrobi), które negatywnie wpływają na wynik prowadzonej reakcji amplifikacji. Otrzymano specyficzne produkty amplifikacji dla każdej badanej grupy bakterii z rodzajów *Pectobacterium* lub *Dickeya* (Fig.2).

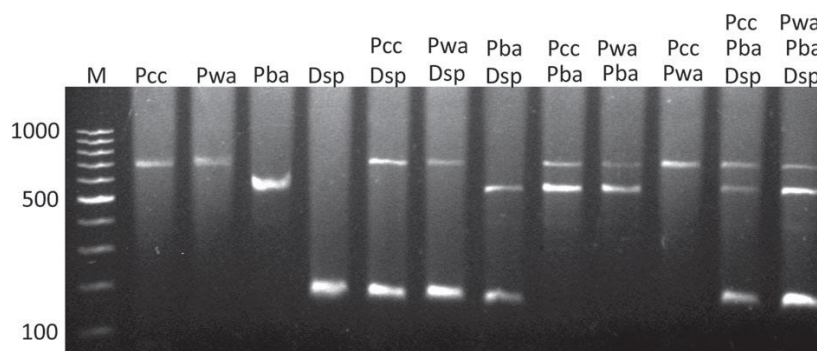


Fig.2. Multipleks PCR - test do wykrywania i identyfikacji głównych patogenów mokrej zgnilizny i czarnej nózki : *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. wasabiae*, *P. atrosepticum* i *Dickeya* spp. Test przeprowadzony z zastosowaniem zarówno pojedynczych jak i mieszanin lizatów komórek bakteryjnych; wielkość produktów amplifikacji dla każdej z grup badanych patogenów 550 pz (Pcc/Pwa), 420 pz (Pba), 130 pz (Dsp). Pwa – *P. wasabiae* 3193, Pcc – *P. carotovorum* subsp. *Carotovorum* Ecc71, Pba – *P. atrosepticum* SCRI 1043, Dsp – *Dickeya* spp. IFB0099, M – wzorzec DNA wielkości 100 pz (Fermentas).

Czułość opracowanego testu *in vitro* określono dla bakterii Dsol i wyniosła ona 0,01 ng μL^{-1} DNA na mieszaninę reakcyjną, podczas gdy czułość wykrywania Pcc i Pba wyniosła 0,1 ng μL^{-1} . Czułość testu wykrywania bakterii w ekstraktach roślinnych określono (w ekstrakcie z tkanki bulw ziemniaka) na 10^3 jtk/ml dla Pwa (10^4 jtk/g tkanki), 10^2 jtk/ml (10^3 jtk/g tkanki) dla Pba i 10 jtk/ml (10^2 jtk/g tkanki) dla Dsol; (w przypadku użytego ekstraktu z tkanki łęcin ziemniaka). Poziomy wykrywalności były bardzo podobne do przedstawionych powyżej tj. 10^3 jtk/ml dla Pw, 10^2 jtk/ml dla Pba i

10² jtk/ml dla Dsol. W przypadku ekstraktów ziemniaczanych, które zakażano więcej niż jednym gatunkiem patogenu (kombinacje Pwa+Pba, Pwa+Dsol, Pba+Dsol i Pwa+Pba+Dsol), czułość testu zmniejszyła się średnio 10–100 razy, ale w przypadku wykrywania Dsol czułość testu pozostawała na takim samym poziomie lub spadała tylko dziesięciokrotnie. Przeprowadzono także badania wykrywania docelowych bakterii w próbach bulw ziemniaka nie wykazujących objawów chorobowych, które mogły być zakażone latentnie. Uzyskane wyniki wykrywania docelowych bakterii patogennych były zgodne w przypadku 85,5% badanych prób z wynikami testów PCR dla pojedynczych par starterów.

Podsumowanie osiągnięcia: **został opracowany i zoptymalizowany test multiplex PCR dla wykrywania i identyfikacji bakteryjnych patogenów ziemniaka z rodzajów *Pectobacterium* (gatunku *P. atrosepticum* oraz *P. carotovorum* i *P. wasabiae*) i *Dickeya*. Opracowana metoda jest użyteczna w rutynowych badaniach sadzeniaków ziemniaka pod kątem występowania tych bakterii.**

A) *Opracowana metoda została opatentowana: „Sposób przygotowania materiału roślinnego oraz sposób wykrywania i identyfikacji bakterii z gatunku *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum* oraz bakterii z rodzaju *Dickeya* spp.” Zgłoszenie patentowe (UP RP) nr 397896 z dnia 2012-01-25. Numer prawa wyłącznego Pat. 223540 z dnia 2016-01-04. Twórcy: Potrykus Marta, Śledź Wojciech, Łojkowska Ewa. Zgłaszający: Uniwersytet Gdański.*

B) *Opisana w publikacji metoda została po dodatkowych testach walidacyjnych wdrożona do rutynowej diagnostyki w Laboratorium Badawczo-Wdrożeniowym MWB UG i GU Med. W roku 2020 w/w laboratorium uzyskało na tę metodę akredytację (nr AB 1760) na zgodność z normą ISO 17025:2018-02 od Polskiego Centrum Akredytacji.*

Omówienie pracy: III. **Molecular methods as tools to control plant diseases caused by *Dickeya* and *Pectobacterium* spp: A minireview**

Jest to jedna z prac, która powstała w czasie mojej opieki jako promotora pomocniczego rozprawy doktorskiej mgr Agaty Motyki

Celem prowadzonych badań było opisanie ważnych cech bakterii z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium*, istotnych dla procesu ich identyfikacji oraz dokonanie przeglądu nowoczesnych i nowo opracowanych metod najczęściej używanych do specyficznego wykrywania i identyfikacji tych fitopatogenów. W pracy wskazano na znaczenie 20-

letnich badań nad populacją bakterii pektynolitycznych SRP (Soft Rot Pectobacteriaceae) na roślinach ziemniakach jako przykładu pomyślnego wdrożenia metod diagnostyki molekularnej do oceny zdrowotności materiału sadzeniowego w Polsce. Pierwsze zakrojone na tak szeroką skalę badania populacji SRP wykonano na szczepach wyizolowanych z roślin kapustnych i/lub roślin ziemniaka porażonych mokrą zgnilizną w sezonach wegetacyjnych w 1996 i 1997. Na podstawie metod biochemicznych, testów fizjologicznych i reakcji PCR stwierdzono, iż *P. atrosepticum* stanowiły 57% składu populacji SRP, a pozostałe zidentyfikowane izolaty oznaczono jako *P. c. carotovorum* (Sławiak M i in., 2009). Większość pozyskanych izolatów *P. atrosepticum* pochodziła z łodyg ziemniaka z objawami czarnej nóżki, a nie z analizowanych bulw. Później, zaimplementowano metodę opartą o analizę *recA* PCR-RFLP do genotypowania *Dickeya* spp. i *Pectobacterium* spp. (Waleron et al. 2002), także pochodzących z innych warzyw niż ziemniak. Stwierdzono, iż wysoka heterogeniczność genomu była charakterystyczna dla szczepów *P. c. carotovorum* (zidentyfikowano 18 charakterystycznych profili genomowych) i *Dickeya* spp. (15 profili) w porównaniu z bakteriami z gatunku *P. atrosepticum* (stwierdzono występowanie tylko 2 profili). Następnie wykorzystano sekwencjonowanie genu *recA* do ponownej oceny pozycji taksonomicznej izolatów SRP zdeponowanych dotąd w kolekcji Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (MWB UG i GUMed), co skutkowało reklasyfikowaniem 14% izolatów *P. c. carotovorum* (Waleron et al. 2002) do gatunku *P. wasabiae*, a następnie do *P. parmentieri* (Waleron i in., 2013). Przeprowadzone analizy wyraźnie wskazały, że izolaty *P. parmentieri* były ważnym składnikiem populacji SRP w Polsce już w roku 1996, jednakże przez cały czas pozostawały „niezauważone” i błędnie sklasyfikowane jako *P. c. subsp. carotovorum*. Oprócz Polski analogiczny trend zaobserwowano w całej Europie. Podobna sytuacja dotyczyła też izolatów *P. c. carotovorum* pozyskanych z roślin lub bulw ziemniaka (Waleron et al. 2002), gdyż niektóre z tych szczepów zostały później reklasyfikowane jako *P. c. brasiliense* lub *P. c. odoriferum* na podstawie analizy sekwencji genów kodujących 16S rRNA, *recA* i *rpoS* (Waleron i in., 2014, 2015).

W roku 2005 bakterie z gatunku *D. solani* zostały wykryte po raz pierwszy na terenie Polski przez naszą grupę badawczą (Sławiak i in., 2009). To skłoniło nasz zespół do przeprowadzenia badań przesiewowych na plantacjach ziemniaka sadzeniaka w latach

2009, 2010, 2011 i 2013 oraz monitoringu wód powierzchniowych w latach 2010-2013 pod kątem obecności tych patogenów. Bakterie *Dickeya* spp. (*D. dianthicola* lub *D. solani*) stanowiły 5% izolatów pozyskanych z prób ziemniaka. W próbach wody szczepy należące do *Dickeya* spp. (ale tylko *D. zeae* i *D. chrysanthemi*) wyizolowano z 0,4% pozyskanych prób co wskazuje, że bakterie *Dickeya* spp. nie stanowią ważnego składnika mikroflory polskich wód (Potrykus i in., 2016). Przeprowadzone profilowanie genomowe w oparciu o metodykę RFLP-PFGE wykazało, iż izolaty *Dickeya* spp. pochodzące z prób wody są bardziej zróżnicowane niż te pozyskane z roślin ziemniaka. Warto też podkreślić, że izolaty z rodzaju *Dickeya* wykryto w większości badanych województwach.

Podsumowanie: przeprowadzone badania jasno wskazują, że skuteczne metody wykrywania i identyfikacji patogenów są bardzo istotne w kontekście monitorowania bakterii z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium* na roślinach oraz w wodach śródlądowych. Dzięki zastosowaniu metod molekularnych, opartych o PCR i sekwencjonowanie wysoce konserwowanych ewolucyjnie genów metabolizmu podstawowego sklasyfikowaliśmy większość polskich izolatów SRP. Przypisanie właściwej pozycji taksonomicznej bakteriom fitopatogennym jest bardzo ważne w przypadku badań nad kontrolą rozprzestrzeniania się poszczególnych gatunków bakterii pektynolitycznych i podejmowaniu działań mających na celu zmniejszenie strat w uprawie roślin powodowanych przez choroby takie jak czarna nóżka i mokra zgnilizna.

Badania bioróżnorodności bakterii pektynolitycznych z rodzaju Dickeya i Pectobacterium występujących w Polsce

W tej części autoreferatu przedstawiam badania dotyczące poznania bioróżnorodności bakterii pektynolitycznych. W kolejnych latach zbadano zróżnicowanie bakterii z gatunków: *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* i *P. parmentieri* izolowanych z plantacji ziemniaka sadzeniaka w Polsce. Opisanie częstości występowania bakterii pektynolitycznych z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium* w Polsce, struktury ich populacji oraz zmienności fenotypowej i genomowej prowadzi do lepszego zrozumienia procesów związanych z patogenezą tych drobnoustrojów, a także może stanowić podstawę do opracowania nowych metod wykrywania i identyfikacji oraz monitorowania wspomnianych bakterii chorobotwórczych.

Omówienie pracy: IV. Population structure and biodiversity of *Pectobacterium parmentieri* isolated from potato fields in temperate climate

Celem badań było monitorowanie występowania i charakterystyka szczepów *P. parmentieri* izolowanych z plantacji ziemniaków sadzeniaków w Polsce. *Pectobacterium parmentieri* jest niedawno wyodrębnionym (Khayi i in., 2016) gatunkiem bakterii pektynolitycznych, należącym do rodziny *Pectobacteriaceae*. Do niedawna szczepy z tego gatunku klasyfikowano do *P. wasabiae*, jednak po kompleksowej analizie genomów opartej o porównawcze metody DDH (ang. DNA-DNA Hybridization method) i ANI (ang. Average Nucleotide Identity method) szczepy *P. wasabiae* pochodzące z ziemniaka zostały zreklasyfikowane jako *P. parmentieri*. Pomimo, że w wielu krajach potwierdzono występowanie *P. parmentieri*, dotychczas nie przeprowadzono kompleksowych badań dotyczących struktury populacji i różnorodności biologicznej szczepów z tego gatunku.

Wyniki badań. *P. parmentieri* wyizolowano z 13% prób ziemniaka sadzeniaka pobranych w latach 2013 i 2014 na terenie Polski. Bakterie z tego gatunku wyizolowano także z chwastów oraz z pobranych prób ziemi. Stwierdzono również, że *P. parmentieri* występuje w niemal wszystkich regionach Polski. Profilowanie genomiczne w oparciu o sekwencje powtarzalne DNA przy zastosowaniu metody REP-PCR ujawniło obecność pięciu odrębnych profili genomowych wśród wyizolowanych szczepów *P. parmentieri*. Najliczniejszym okazał się być profil REP I (44%). Wykonana analiza filogenetyczna na podstawie sekwencji genu *recA* skutkowałą wyodrębnieniem dwóch kładów wśród badanych izolatów *P. parmentieri*. W obu kładach znajdowały się szczepy wyizolowane zarówno w roku 2013 jak i w 2014 roku. Analiza fenotypowa cech wysoce istotnych dla zjadliwości bakterii pektynolitycznych obejmująca wyznaczenie aktywności pektynaz, celulaz i proteaz, produkcji sideroforów oraz efektywności w maceracji tkanki ziemniaka wykazała różnice pomiędzy charakteryzowanymi szczepami *P. parmentieri*.

Podsumowanie osiągnięcia. **W ramach przeprowadzonych badań po raz pierwszy szczegółowo scharakteryzowano strukturę genomową populacji *P. parmentieri* pochodzącej z plantacji nasiennych ziemniaka sadzeniaka.** Warto podkreślić, że szczepy wyizolowano w trakcie dwóch następujących po sobie sezonów wegetacyjnych w warunkach klimatu umiarkowanego. Wysoką heterogeniczność w obrębie tego nowo wyodrębnionego gatunku potwierdzono na podstawie charakterystyki genotypowej i fenotypowej uwzględnionych szczepów *P. parmentieri*. Ponieważ dotąd wdrożone

środki zwalczania mokrej zgnilizny i czarnej nóżki ziemniaka obejmują wyłącznie metody zapobiegawcze, obecnie niezwykle istotne wydaje się prowadzenie badań monitoringowych i poszerzanie wiedzy na temat bioróżnorodności wśród szczepów bakterii pektynolitycznych, w tym *P. parmentieri*.

Omówienie pracy: V. The occurrence of bacteria from different species of *Pectobacteriaceae* on seed potato plantations in Poland

Celem przeprowadzonych badań była analiza częstości występowania różnych grup bakterii z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium* na plantacjach ziemniaka sadzeniaka w Polsce w latach 2013 i 2014. Zbadano źródła pochodzenia bakterii, sezonową zmienność w występowaniu oraz rodzaj nawożenia aplikowany na badane plantacje ziemniaków sadzeniaków. Materiał roślinny pochodził z 58 różnych odmian ziemniaka i został zebrany na terenie 13 województw w 2013 r. oraz 12 w 2014.

Wyniki badań. W latach 2013 i 2014 wyizolowano odpowiednio 101 i 104 szczepy bakterii należących do rodziny *Pectobacteriaceae*. Bakterie SRP wykryto w próbach z 11 województw w 2013 oraz z 12 województw w 2014 r. *Pectobacterium* spp. izolowano zdecydowanie częściej, niż bakterie z rodzaju *Dickeya*. Najpowszechniej występującymi gatunkami bakterii pektynolitycznych na plantacjach ziemniaka sadzeniaka w Polsce okazały się być *P. carotovorum* (36% w 2013, 31% w 2014), *P. atrosepticum* (26% w 2013, 38% w 2014) oraz *P. parmentieri* (32% w 2013, 23% w 2014). Zestawiając zebrane rezultaty z efektami poprzednich prac naszego zespołu, *Pectobacterium* spp. były główną przyczyną mokrej zgnilizny i czarnej nóżki na ziemniaku w Polsce w latach 1996-2014 w przeciwieństwie do bakterii z rodzaju *Dickeya*, których populacja była niewielka i stabilna od czasu pierwszego wykrycia tych drobnoustrojów w naszym kraju w roku 2005 (jak już podano wcześniej).

Badane próby (łodygi ziemniaka, bulwy ziemniaka i tzw. chwasty towarzyszące) z pól ziemniaka sadzeniaka były zbierane na przestrzeni 5 miesięcy w 2013 r. (maj-wrzesień) oraz 4 miesięcy w 2014 r. (czerwiec-wrzesień). Co ciekawe, w przypadku prób zebranych w sierpniu i wrześniu 2013 r. wykryto wysoki odsetek występowania analizowanych bakterii *Pectobacteriaceae*. Należy też podkreślić, iż bakterie *Pectobacteriaceae* głównie izolowano w łodyg ziemniaka (średnio w 65%) a z chwastów tylko około w 6,5%.

Podsumowanie osiągnięcia: W wyniku przeprowadzonych badań wykazałem, że bakterie z gatunków: *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* i *P. parmentieri* były w naszym kraju szeroko rozpowszechnione od roku 1997 i przewyższały liczebnie populację bakterii z rodzaju *Dickeya*, które po raz pierwszy wykryto w Polsce w roku 2005. Na podstawie wyników naszych wcześniejszych badań można stwierdzić, że bakterie *Dickeya* spp. nigdy nie odgrywały dominującej roli w populacji bakterii pektynolitycznych w Polsce. Bardzo ciekawym okazał się fakt, iż w trakcie obu analizowanych sezonów wegetacyjnych najwyższą liczbę szczepów z rodziny *Pectobacteriaceae* wyizolowano w lipcu i był to jedyny miesiąc, w którym potwierdzono obecność bakterii ze **wszystkich analizowanych gatunków na sadzeniakach ziemniaków w Polsce. Badania potwierdziły również możliwość koinfekcji roślin ziemniaka bakteriami należącymi do 2 lub 3 różnych gatunków SRP.** Najczęstszymi koinfekcjami były te powodowane przez *P. parmentieri* i *P. carotovorum*. Ponadto wykazano, że szczepy *Pectobacteriaceae* wyizolowano z większości badanych odmian ziemniaka. Przeprowadzone badania nad pochodzeniem i występowaniem fitopatogenów pektynolitycznych mogą przyczynić się do skuteczniejszej oceny ryzyka związanego z infekcjami wywoływanymi przez różne gatunki *Pectobacteriaceae*.

Omówienie pracy: VI. Genotypic and phenotypic uniformity among the population of *Pectobacterium atrosepticum* strains isolated during three growing seasons from potato fields in Poland

Celem badań była charakterystyka szczepów należących do gatunku *Pectobacterium atrosepticum* wyizolowanych z pól ziemniaka sadzeniaka na terenie Polski. Próby roślin *S. tuberosum* z objawami czarnej nóżki (czernienie podstawy łodygi prowadzące do więdnienia całej rośliny) i/lub mokrej zgnilizny bulw (maceracja wewnętrznej tkanki bulw tzw. miękka zgnilizna) z pól oraz przechowalni, chwastów towarzyszących im na polu zostały przesłane przez pracowników Państwowej Inspekcji Ochrony Roślin i Nasiennictwa do laboratorium ZOBR. W sumie scharakteryzowano 118 izolatów (35 z roku 2013, 41 z roku 2014 i 42 z roku 2016), które zostały zidentyfikowane jako bakterie należące do gatunku *P. atrosepticum* za pomocą reakcji multiplex PCR ze starterami specyficznymi dla tego gatunku czyli Y45 i Y46 opisanymi przez Frechon i

in. (1998). Szczepy te poddano badaniom profilowania genomowego opartego na metodzie rep-PCR z zastosowaniem starterów typu BOX, ERIC i REP. Przeprowadzono także badania filogenetyczne i fenotypowe dla Polskich izolatów z tego gatunku.

Stwierdzono, iż najskuteczniejszą metodą różnicowania genetycznego izolatów *P. atrosepticum* była analiza oparta na badaniu obecności sekwencji powtarzalnych BOX. Zastosowanie tej metody pozwoliło mi na klasyfikację 118 szczepów *P. atrosepticum*, izolowanych z roślin ziemniaka w Polsce, do 6 różnych profili BOX. Profil genomowy IV BOX-PCR był tym najczęściej obserwowanym (wykazywało go blisko 60% izolatów). Na podstawie wyników profilowania genomowego opartego o wykorzystanie starterów BOX, 23 izolaty z gatunku *P. atrosepticum* wykazujące zróżnicowanie genetyczne oraz wyizolowane w różnych latach zostały wyselekcjonowane do dalszych badań.

Analizę filogenetyczną Polskiej populacji *P. atrosepticum* wykonano w oparciu o wysoce konserwowane geny kodujące białka zaangażowane w metabolizm podstawowy komórki tj. *recA* (kodujący rekombinazę A), *gyrA* (kodujący podjednostkę A gyrazy) i *rpoS* (kodujący jedną z form czynnika sigma: σ^{38} (RpoS), będącą podjednostką kompleksu polimerazy RNA). Sekwencja genu *recA* okazała się być identyczna w przypadku wszystkich badanych izolatów *P. atrosepticum*, podczas gdy dla sekwencji *gyrA* zidentyfikowano jeden polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP; ang. single nucleotide polymorphism) odróżniający jeden izolat (należący do profilu I BOX) od innych izolatów *P. atrosepticum*. Analiza sekwencji genu *rpoS* wykazała występowanie 16 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) w obrębie badanych izolatów *P. atrosepticum*. W oparciu o analizę sekwencji *rpoS* wykonano analizę filogenetyczną, która ujawniła, że większość, tj. 19, uwzględnionych w badaniach izolatów środowiskowych *P. atrosepticum* oraz szczep referencyjny *P. atrosepticum* LMG 2386^{TS} grupuje się w obrębie jednego kladu. Co ciekawe, następny kład składał się wyłącznie z dwóch szczepów *P. atrosepticum* IFB5660 i IFB5661, charakteryzujących się profilem BOX V.

Analiza fenotypowa izolatów *P. atrosepticum*: polegała na scharakteryzowaniu cech istotnych dla wirulencji u badanych szczepów *P. atrosepticum*. Wykazano zmienność w zdolności do maceracji tkanki ziemniaka w różnych temperaturach tj. 20°C, 28°C i 37°C, do wzrostu w środowisku o podwyższonym zasoleniu, a także aktywności enzymów mających wpływ na wywoływanie objawów chorobowych na roślinie.

Oszacowano zdolność izolatów *P. atrosepticum* do macerowania tkanki bulw ziemniaka w dwóch różnych temperaturach, tj. w 20°C lub 28°C. W efekcie przeprowadzonych badań stwierdziłem, że wyizolowane w Polsce szczepy *P. atrosepticum* charakteryzują się wyższym stopniem zdolności do macerowania tkanki bulw ziemniaka przy niższej temperaturze; zdolność do maceracji badanych izolatów utrzymywała się na podobnym poziomie pomimo, iż zostały przyporządkowane do różnych profili genomowych BOX. Żaden z polskich izolatów *P. atrosepticum* nie wykazywał wzrostu w temperaturze 37 °C. Polskie szczepy nie wykazywały zdolności do namnażania się w warunkach podwyższonego zasolenia (5% zasolenia). Badanie aktywności pektynaz wskazało na minimalne różnice w aktywności tych enzymów pomiędzy polskimi izolatami *P. atrosepticum*. W przypadku badania aktywności celulaz zdecydowana większość izolatów *P. atrosepticum* wykazywała niską aktywność celulazy. Większą zmiennością charakteryzowały się polskie izolaty *P. atrosepticum* w badaniu w kierunku aktywności proteaz. Około jedna trzecia izolatów *P. atrosepticum*, charakteryzowała się niską zdolnością do produkcji proteaz. Poziom aktywności proteaz, tak jak pektynaz i celulaz u polskich izolatów *P. atrosepticum* nie był skorelowany z obserwowanymi profilami genomowymi BOX. Pod względem wydajności w produkcji sideroforów, które są niezbędne do kontroli poziomu żelaza w komórce bakteryjnej, zaobserwowano pewne różnice w przypadku niektórych izolatów *P. atrosepticum*, jednak były one nieistotne statystycznie.

Podsumowanie: Przeprowadzona, szczegółowa i szeroka, charakterystyka izolatów bakterii z gatunku *P. atrosepticum* wyizolowanych w Polsce w ciągu trzech sezonów wegetacyjnych dostarczyła dowodów na niskie zróżnicowanie genetyczne bakterii z tego gatunku oraz duże znaczenie tego fitopatogena dla upraw ziemniaka w warunkach klimatu umiarkowanego. Ponieważ obecne podejścia do kontroli bakterii SRP opierają się wyłącznie na profilaktyce (o czym wspomniałem we wstępie), właściwa identyfikacja czynnika chorobotwórczego, oprócz zgromadzenia wiedzy na temat jego bioróżnorodności, aktywności czynników związanych z wirulencją i mechanizmów interakcji z rośliną żywicielską, ma kluczowe znaczenie do budowania perspektywy rozwoju procedur zwalczania tego agrofaga oraz opracowania nowych, doskonalszych metod jego wykrywania i identyfikacji.

Poniżej omówię publikacje, których celem było opracowanie alternatywnych, a przede wszystkim proekologicznych, metod kontroli/zwalczania patogenów bakteryjnych infekujących ekonomicznie istotne rośliny uprawne. Biorąc pod uwagę zdecydowanie większą akceptację społeczeństwa dla tzw. „zielonych” metod kontroli związanej także z dominującą tendencją do wyboru bioproduktów zamiast środków ochrony wytwarzanych w tradycyjny sposób, postanowiłem ocenić działanie przeciwbakteryjne naturalnego związku jakim jest kofeina, a także ocenić możliwości zastosowania systemu reakcyjno-wyładowczego generującego zimną plazmę atmosferyczną typu dc-APGD (ang. *Direct Current Atmospheric Pressure Glow Discharge*, czyli stałoprądowe wyładowania jarzeniowe generowane pod ciśnieniem atmosferycznym) do eliminacji komórek bakteryjnych patogenów roślin. Kolejne badania dotyczyły wykazania właściwości przeciwdrobnoustrojowych nanocząstek srebra pozyskanych ekologiczną metodą opartą o wykorzystanie dc-APGD, względem patogenów roślin podlegających przymusowemu zwalczaniu (ang. *quarantine pests*).

Omówienie pracy: VII. **Antibacterial activity of caffeine against plant pathogenic bacteria.**

Celem badania była ocena właściwości przeciwbakteryjnych wtórnego metabolitu roślinnego - kofeiny, jak i ewaluacja możliwości wykorzystania tej substancji w celu ochrony roślin. Kofeina (1,3,7-trimetyloksantyna, CAF) jest alkaloidem purynowym syntezowanym przez ponad 100 gatunków roślin z czego te najbardziej znane to krzewy i drzewa z rodziny marzanowatych, czyli kawowców (Ashihara, 2006). Zbadano antybakteryjne właściwości kofeiny w odniesieniu do następujących gatunków bakterii: *P. atrosepticum*, *P. c.* subsp. *carotovorum* (obecnie *P. carotovorum*) i *D. solani*, ale także w stosunku do bakterii z gatunków: *Ralstonia solanacearum* (Rsol), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) (obecnie *Clavibacter sepedonicus*), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) i *Xanthomonas campestris* subsp. *campestris* (Xcc) (obecnie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*); część z nich podlega przymusowemu zwalczaniu.

Wyniki badań. Wykazano, iż kofeina posiada właściwości antybakteryjne wobec wszystkich badanych bakterii chorobotwórczych względem roślin. Kofeina hamowała wzrost wszystkich ujętych w testach drobnoustrojów w sposób zależny od aplikowanego stężenia i dawki. Wartości wyznaczonego minimalnego stężenia

hamującego (ang. *Minimal Inhibitory Concentration*; MIC) mieściły się w zakresie stężeń kofeiny od 5 do 20 mM. Wartości zdefiniowanego minimalnego stężenia bakteriobójczego (ang. *Minimal Bactericidal Concentration*; MBC) mieściły się w zakresie stężeń od 43 do 100 mM kofeiny. Stwierdziłem również wpływ suplementacji kofeiną na zmianę morfologii komórek bakteryjnych. (Fig. 3 AB). Dodatek tego alkaloidu powodował, że komórki Xcc tworzyły długie łańcuchy (Fig. 3 CD), a komórki Cms wykazywały nieprawidłową morfologię i prawdopodobnie ulegały lizie (Fig.3 EF).

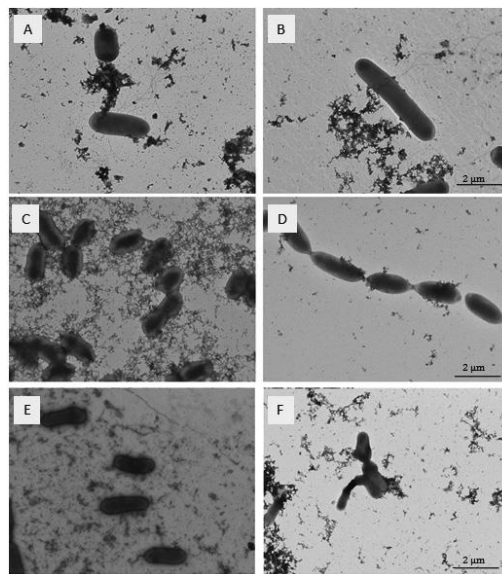


Fig 3. Morfologia komórek bakterii rosnących na pożywce zawierającej 8 mM kofeiny w porównaniu do prób kontrolnych: (A) *Dickeya solani* – 0 mM kofeiny, (B) *Dickeya solani* – 8 mM kofeiny, (C) *Xanthomonas campestris* subsp. *campestris* – 0 mM kofeiny, (D) *Xanthomonas campestris* subsp. *campestris* – 8 mM kofeiny, (E) *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* - 0 mM kofeiny, (F) *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* - 8 mM kofeiny.

Stwierdziłem także wpływ kofeiny na hamowanie biosyntezy DNA, RNA i białek w komórkach badanych bakterii; oszacowano oddziaływanie kofeiny przez pomiar wcielania radioaktywnych prekursorów wymienionych związków wg. procedury opisanej przez Węgrzyna i in., 1991. Wykazałem, iż replikacja DNA była zwykle hamowana podczas 90 minutowej ekspozycji na 5 mM roztwór kofeiny w przypadku Dsol, Rsol i Pba, ale nie w przypadku Pcc, Pst lub Xcc. Natomiast transkrypcja RNA była znacząco zredukowana przez 5 mM roztwór kofeiny już po 15 minutach traktowania komórek bakterii Dsol, Pba i Pcc. Nie zaobserwowaliśmy istotnych zmian w przypadku biosyntezy białek nawet przy 120 minutowej ekspozycji na użyte stężenie

kofeiny. Wykazałem także, iż ekspozycja bakterii Pba na 8 mM roztwór kofeiny przez 336 h nie powoduje indukcji odporności bakterii na ten związek.

Podsumowanie osiągnięcia. Wykazałem, iż kofeina posiada właściwości antybakteryjne przeciwko szerokiemu spektrum bakterii chorobotwórczych dla roślin i w związku z tym może znaleźć zastosowanie jako przyjazny środowisku, naturalny biopestycyd.

W oparciu o otrzymane w w/w projekcie wyniki uzyskano patent krajowy: „Środek oraz sposoby ochrony roślin przed bakteriami oraz sposób otrzymywania środka do ochrony roślin przed bakteriami (zastosowanie kofeiny)”. Zgłoszenie patentowe (UP RP) nr 404115 z dnia 2013-05-28. Numer prawa wyłącznego Pat. 233502 z dnia 2019-10-31. Twórcy: Śledź Wojciech, Łoś Emilia, Banecki Bogdan, Łojkowska Ewa. Zgłaszający: Uniwersytet Gdański

Omówienie pracy: **VIII. Rapid eradication of bacterial phytopathogens by atmospheric pressure glow discharge generated in contact with a flowing liquid cathode**

Celem badań było określenie przydatności zastosowania układu reakcyjno-wyładowczego generującego zimną plamę atmosferyczną w efekcie wytworzenia stałoprądowego wyładowania jarzeniowego generowanego pod ciśnieniem atmosferycznym (dc-APGD) do eradykacji wybranych bakterii patogennych dla roślin uprawnych. Badania przeprowadzono na szczepach referencyjnych następujących gatunków bakterii: *C. m. subsp. sepedonicus* (obecnie *C. sepedonicus*), *D. solani*, *X. c. pv. campestris*, *P. atrosepticum* i *P. c. subsp. carotovorum* (obecnie *P. carotovorum*). Co ważne bakterii z wyżej wymienionych gatunków mogą rozprzestrzeniać się różnymi drogami, m.in. poprzez wody przemysłowe stanowiące pozostałość po myciu owoców i warzyw. W badaniach zastosowano opracowany przez mój zespół, we współpracy z naukowcami z Politechniki Wrocławskiej z grupy badawczej Prof. dr hab. inż. Pawła Pohla, autorski układ reakcyjno-wyładowczy, który charakteryzuje się wysokim poziomem innowacyjności. Układ pracuje w trybie przepływowym, a wyładowania jarzeniowe generowane są pod ciśnieniem atmosferycznym w kontakcie z przepływającą zawiesiną bakteryjną pełniącą rolę ciekłej katody. Dla zobrazowania opracowanego układu reakcyjno-wyładowczego przedstawiono jego schemat konstrukcyjny (Fig.4)

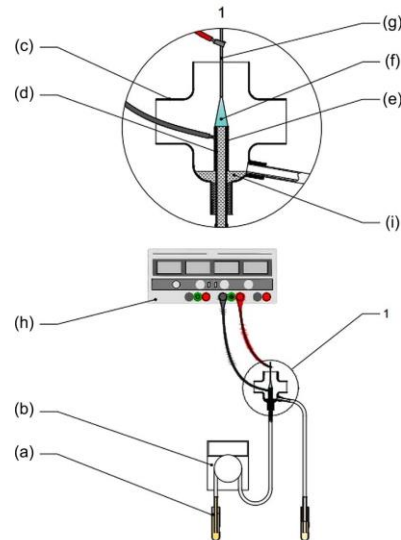


Fig.4. Schematyczna ilustracja przepływowego układu reakcyjno-wyładowczego generującego plazmę typu dc-APGD opracowanego w celu szybkiej eliminacji bakterii fitopatogennych z roztworów wodnych. Do układu pompowana jest zawieszina bakteryjna (a) (powiększony w okręgu u góry i oznaczony jako 1), gdzie następuje proces dekontaminacji. a) zawieszina bakteryjna, b) pompa perystaltyczna, (c) komora kwarcowa, (d) kapilara kwarcowa, (e) grafit rurka, (f) dc-APGD, (g) elektroda wolframowa typu pin, (h) generator dc-HV, (i) roztwór poddany działaniu plazmy typu dc-APGD

Wyniki badań. Logarytm redukcji w liczbie żywych komórek bakterii chorobotwórczych dla roślin wahał się od 3,43 aż do całkowitej eradykacji fitopatogenów. W ujęciu procentowym efektywność eradykacji bakterii wyniosła od 99,996% do 100%. Zauważono różnice pomiędzy bakteriami z różnych gatunków we wrażliwości na działanie plazmy. Najbardziej wrażliwe były bakterie z gatunków: Cms, Dsol i Xcc w przypadku których zaobserwowano całkowitą eliminację żywych komórek bakterii. Natomiast bakterie z gatunków Pcc i Pba okazały się być bardziej odporne na działanie plazmy. Warto podkreślić, że raportowaną skuteczność układu generującego dc-APGD uzyskano już po krótkim (60 s) czasie ekspozycji. Przeprowadzone badania wykazały, iż interakcja plazma-ciecz indukuje powstanie reaktywnych form tlenu i azotu (NO_x, NH₃, H₂O₂, O₂, O, and OH) oraz promieniowania UV i te czynniki uznano za odpowiadające za obserwowane antybakteryjne właściwości wytworzonego wyładowania.

Podsumowanie osiągnięcia. Wykazano, że opracowany system reakcyjno-wyładowczy oparty na plazmie typu dc-APGD stanowi skuteczną metodę kontroli/zwalczania bakterii chorobotwórczych względem roślin, w tym Xcc, Cms, Pcc, Pba i Dsol obecnych w roztworach wodnych. Zaproponowany nowatorski system reakcyjno-wyładowczy pracuje w trybie przepływowym jest pierwszym oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego związanego ze zwalczaniem fitopatogenów bakteryjnych w cieczy z zastosowaniem technologii plazmowej. System oparty na dc-APGD w ciągłym przepływie może zostać wykorzystany przykładowo do dezynfekcji wody używanej do nawadniania upraw na polach lub szklarniach, do eliminacji bakterii z wody przemysłowej (pozostającej po myciu warzyw i owoców), ścieków rolniczych, zużytych pożywek hydroponicznych czy odpadów płynnych z laboratoriów mikrobiologicznych. Warto podkreślić, że opracowany system reakcyjno-wyładowczy charakteryzuje się bardzo niskim zużyciem energii (~55 W).

Powyższe osiągnięcie zostało opatentowane: „Sposób eradykacji bakteryjnych fitopatogenów z zastosowaniem stałoprądowego wyładowania jarzeniowego”. Zgłoszenie patentowe (UP RP) nr P.419246 z dnia 2016-10-26. Numer prawa wyłącznego Pat. 236055 z dnia 2020-07-24. Twórcy: Łojkowska Ewa, **Śledź Wojciech**, Motyka Agata, Anna Dzimitrowicz, Piotr Jamróż, Paweł Pohl. Zgłaszający: Politechnika Wroclawska i Uniwersytet Gdański.

Omówienie pracy: IX. **Antibacterial Activity of Fructose-Stabilized Silver Nanoparticles Produced by Direct Current Atmospheric Pressure Glow Discharge towards Quarantine Pests**

Celem badań było opracowanie proekologicznej metody syntezy nanocząstek srebra stabilizowanych fruktozą (ang. *Fructose-stabilized Silver Nanoparticles*, FRU-AgNPs) za pomocą zimnej plazmy atmosferycznej typu dc-APGD oraz określenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej tak uzyskanych nanocząstek względem ważnych gospodarczo bakteryjnych patogenów roślin takich jak: *Erwinia amylovora* (Eam), *C. michiganensis* (Cm), *R. solanacearum* (Rsol), *X. c. pv. campestris* (Xcc) i *D. solani* (Dsol). Metoda wykorzystująca do syntezy nanocząstek dc-APGD jest korzystna ekonomicznie i nie wymaga zastosowania dodatków w postaci toksycznych reduktorów.

Jak już wspomniano wcześniej obecnie poszukuje się nowych alternatywnych, a przede wszystkim ekologicznych rozwiązań w walce z chorobami roślin. Dlatego mój zespół podjął się badań nad możliwością zastosowania dc-APGD wytwarzanego w ciągłym przepływie do syntezy stabilnych AgNPs. Roztwór przepływającego prekursora AgNPs (AgNO_3) i stabilizatora (D-fruktoza) stanowił ciekłą anodę (ang. *Flowing Liquid Anode*; FLA), w obrębie której dochodziło do wytworzenia reaktywnych form tlenu i azotu (ang. *Reactive Oxygen and Nitrogen Species*, RONS) i rodników wodorowych (H) w efekcie interakcji plazma-ciecz, które to oddziaływania prowadziły następnie do redukcji jonów Ag(I) i były odpowiedzialne za wytworzenie AgNP. Właściwości zsyntetyzowanych nanocząstek FRU-AgNP analizowano za pomocą spektrofotometrii UV/Vis, transmisyjnej mikroskopii elektronowej (ang. *Transmission Electron Microscopy*, TEM) wspieranej przez spektroskopię rentgenowską z dyspersją energetyczną (ang. *Energy Dispersive X-Ray Scattering*, EDX) i dyfrakcję elektronów w wybranym obszarze (ang. *Selected Area Electron Diffraction*, SAED) oraz metodę dynamicznego rozpraszania światła (ang. *Dynamic Light Scattering*, DLS). Aby potwierdzić funkcjonalizację powierzchni AgNP za pomocą FRU (dobrej jako stabilizator, która powoduje indukcję chemotaksji u wybranych bakterii fitopatogennych), zastosowano spektroskopię atenuowanego (osłabionego) całkowitego odbicia w poczerwieni z transformacją Fouriera (ang. *Attenuated Total Reflection-Fourier Transformation Infrared Spectroscopy*, ATR FT-IR). Właściwości antybakteryjne FRU-AgNP przeciwko fitopatogenom bakteryjnym określono na podstawie dwóch parametrów tj. minimalnego stężenia hamującego (MIC) i minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) w odniesieniu do wybranych i wymienionych powyżej gatunków bakterii chorobotwórczych względem roślin.

Wyniki badań. Otrzymano kuliste i charakteryzujące się stabilnością w czasie nanocząstki FRU-AgNP o średnich wymiarach $14,9 \pm 7,9$ nm i $15,7 \pm 2,0$ nm. W ramach przeprowadzonych analiz wykazano, że otrzymane nanocząstki posiadały właściwości antybakteryjne w odniesieniu do wszystkich analizowanych fitopatogenów. Szczepy z gatunków Eam, Cm i Xcc okazały się być bardziej podatne (MIC wynosił $1,64 \text{ mg L}^{-1}$) na wytworzone nanostruktury niż inne ujęte gatunki bakterii. Z drugiej strony szczep Dsol wykazał się najwyższą odpornością na działanie

FRU-AgNP przy MIC wynoszącym 13,1 mg L⁻¹. Ciekawym przypadkiem był szczep R_{sol}, dla którego zarówno wartości stężenia MIC jak i MBC wyniosły 6,58 mg L⁻¹.

W efekcie przeprowadzonych badań pozyskano nanostruktury FRU-AgNP w wyniku zastosowania „zielonej” metody ich syntezy z zastosowaniem plazmy typu dc-APGD. Uzyskane w wyniku opracowanej procedury nanocząstki srebra mogą być alternatywną metodą w walce z bakteryjnymi patogenami roślin, w tym drobnoustrojami podlegającymi przymusowemu zwalczaniu.

Podsumowanie osiągnięcia. Opracowano wydajną, szybką, przyjazną środowisku i ekonomicznie opłacalną metodę syntezy jednolitych i stabilnych w czasie nanocząstek FRU-AgNPs. Otrzymane nanostruktury posiadały właściwości antybakteryjne w odniesieniu do badanych bakteryjnych fitopatogenów. Opisane osiągnięcie wpisuje się w politykę ochrony roślin stosowaną przez European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO).

Literatura

1. Acuna B, Riffo F. Blackleg survey and potential of latent infection (*Erwinia* spp) in certified potato seed lots in the tenth region of Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA Chile, Agricultura Tecnica 1993;53(2):179–183. ISSN:0365-2807
2. Ashihara H. Metabolism of alkaloids in coffee plants. Brazil J Plant Physiol 2006; 18: 1–8. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202006000100001>.
3. Boluk G, Dobhal S, Arizala D, Alvarez AM, Arif M. *Dickeya colocasiae* sp. nov. isolated from wetland taro, *Colocasia esculentum*. BioRxiv 2022. <https://doi.org/10.1101/2022.01.14.476417>.
4. Brady CL, Cleenwerck I, Denman S, Venter SN, Rodríguez-Palenzuela P, Coutinho TA, et al. Proposal to reclassify *Brenneria quercina* (Hildebrand and Schroth 1967) Hauben et al., 1999 into a new genus, *Lonsdalea* gen. nov., as *Lonsdalea quercina* comb. nov., descriptions of *Lonsdalea quercina* subsp. *quercina* comb. nov., *Lonsdalea quercina* subsp. *iberica* subsp. nov. and *Lonsdalea quercina* subsp. *britannica* subsp. nov., emendation of the description of the genus *Brenneria*, reclassification of *Dickeya dieffenbachiae* as *Dickeya dadantii* subsp. *dieffenbachiae* comb. nov., and emendation of the description of *Dickeya dadantii*. Int J Syst Evol Microbiol 2012;62:1592–602. <http://dx.doi.org/10.1099/ijms.0.035055-0>.
5. Burkholder WR, McFadden LA, Dimock EW. A bacterial blight of Chrysanthemums. Phytopathology 1953;43:522–6.
6. Christofi N, Wilson MI, Old DC. Fimbriae and haemagglutinins in erwinias of the carotovora group. J Appl Bacteriol 1979;46:179–83. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1979.tb02597.x>.
7. Czajkowski R, Perombelon MCM, van Veen JA, van der Wolf JM. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. Plant Pathol 2011; 60(6) :999-1013. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02470.x>
8. Dees MW, Lysøe E, Rossmann S, Perminow J, Brurberg MB. *Pectobacterium polaris* sp. nov., isolated from potato (*Solanum tuberosum*). Int J Syst Evol Microbiol 2017b; 67:5222–5229. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.00244>.
9. Degefu Y, Potrykus M, Golanowska M, Virtanen E, Lojkowska E. A new clade of *Dickeya* spp. plays a major role in potato blackleg outbreaks in North Finland. Ann Appl Biol 2013;162:231–241. <https://doi.org/10.1111/aab.12020>.
10. Ellis SD, Boehm MJ.. Plants Get Sick Too! Plant Diseases Idea Starter. *The Plant Health Instructor*. 2009. <https://doi.org/10.1094/PHI-K-2009-0511-01>.
11. Fagard M, Dellagi A, Roux C, Périno C, Rigault M, Boucher V, Shevchik VE, Expert D. *Arabidopsis thaliana* expresses multiple lines of defense to counterattack *Erwinia chrysanthemi*. Mol Plant–Microbe Interact. 2007;20:794–805. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-7-0794>.

12. FAO (2012). Food and Agriculture Organization. <http://faostat.fao.org>.
13. Frechon D, Exbrayat P, Helias V, Hyman LJ, Jouan B, Llop P. Evaluation of a PCR kit for the detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potato tubers. *Potato Res* 1998;41:163–73. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02358439>.
14. Gallois A, Samson R, Ageron E, Grimont PAD. *Erwinia carotovora* subsp. *odorifera* subsp. nov., Associated with Odorous Soft Rot of Chicory (*Cichorium intybus* L.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1992;42:582–588. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-4-582>.
15. Gardan L, Gouy C, Christen R, Samson R. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:381–91. <http://dx.doi.org/10.1099/ijms.0.02423-0>.
16. Grenier AM, Duport G, Pagès S, Condemine G, Rahbé Y. The Phytopathogen *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi* 3937) Is a Pathogen of the Pea Aphid. *Appl Environ Microbiol* 2014;72(3). <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1956-1965.20>.
17. Hauben L, Moore ERB, Vauterin L, Steenackers M, Mergaert J, Verdonck L, et al. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Syst Appl Microbiol* 1998;21:384–97. [http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020\(98\)80048-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020(98)80048-9).
18. Hong S-M, Ten LN, Park K-T, Back Ch-G, Waleron M, Kang I-K, Lee S-Y, Jung H-Y. *Pectobacterium jejuense* sp. nov. Isolated from Cucumber Stem Tissue. *Curr Microbiol* 2023; 1:80(9):308. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03419-5>
19. Huang J. Ultrastructure of bacterial penetration in plants. *Annu Rev Phytopathol* 1986;24:141–57. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.py.24.090186.001041>
20. Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Brochier-Armanet C., Flandrois JP, Reverchon S. *Dickeya poaceaphila* sp. nov., a plant-pathogenic bacterium isolated from sugar cane (*Saccharum officinarum*). *Int J Syst Evol Microbiol* 2020;70:4508–4514. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004306>.
21. Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Van Gijsegem F. Diversity within the *Dickeya zeae* complex, identification of *Dickeya zeae* and *Dickeya oryzae* members, proposal of the novel species *Dickeya parazeae* sp. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2021;71 <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005059>.
22. Hugouvieux-Cotte-Pattat N, des-Combes CJ, Briolay J, Pritchard L. Proposal for the creation of a new genus *musicola* gen. nov., reclassification of *Dickeya paradisiaca* (Samson et al. 2005) as *Musicola paradisiaca* comb. nov. and description of a new species *Musicola keenii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2021a;71. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005037>
23. Hugouvieux-Cotte-Pattat N, des-Combes CJ, Briolay J. *Dickeya lacustris* sp. nov., a water-living pectinolytic bacterium isolated from lakes in France *Int J Syst Evol Microbiol* 2019;69:721–726. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003208>
24. Kang HW, Kwon SW, Go SJ. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* by primers generated from a URPPCR fingerprinting-derived polymorphic band. *Plant Pathol* 2003;52:127–33. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00822.x>.
25. Khayi S, Blin P, Chong TM, Chan KG, Faure D. Complete genome anatomy of the emerging potato pathogen *Dickeya solani* type strain IPO 2222 T. *Stand Genomic Sci* 2016; 11:87. <http://dx.doi.org/10.1186/s40793-016-0208-0>
26. Khayi S, Cigna J, Chong TM, Quêtu-Laurent A, Chan K-G, et al. Transfer of the potato plant isolates of *Pectobacterium wasabiae* to *Pectobacterium parmentieri* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016b;66:5379–5383. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.001524>
27. Klair D, Arizala D, Dobhal S, Boluk G, Alvarez AM, Arif M, *Pectobacterium colocasium* sp. nov. isolated from taro (*Colocasia esculenta*). *bioRxiv* 2022; <https://doi.org/10.1101/2022.02.08.479620>.
28. Koh Y, Kim G, Lee Y, Sohn S, Koh H, Kwon S, et al. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *actinidiae* subsp. nov., a new bacterial pathogen causing canker-like symptoms in yellow kiwifruit, *Actinidia chinensis*. *N Z J Crop Hort Sci* 2012;40:269–79. <http://dx.doi.org/10.1080/01140671.2012.707129>.
29. Lacey MS. Studies in bacteriosis, XIII: a soft rot of potato tubers due to *Bacillus carotovorus* and a comparison of the cultural, pathological and serological behaviour of various organisms causing soft rots. *Ann Appl Biol* 1926;13:1–11. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-48.1926.tb04248.x>.
30. Laurila J, Hannukkala A, Nykyri J, Pasanen M, Hélias V, Garland L, et al. Symptoms and yield reduction caused by *Dickeya* spp. strains isolated from potato and river water in Finland. *Eur J Plant Pathol* 2010;126:249–62. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-009-9537-9>.
31. Ma B, Hibbing M, Kim H, Reedy R. Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology* 2007;97:1150–63. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-97-9-1150>.

32. Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 2012;13:614–29. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>.
33. McCarter-Zorner NJ, Franc G, Harrison M et al. , 1984. Soft rot *Erwinia* bacteria in surface and underground waters in southern Scotland and in Colorado, United States. *J App Microbiol* 57, 95–105. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1984.tb02361.x>
34. Molina JJ, Harrison MD,. The role of *Erwinia carotovora* in the epidemiology of potato blackleg 1. Relationship of *E. carotovora* var. *carotovora* and *E. carotovora* var. *atroseptica* to potato blackleg in Colorado. *American Potato Journal*, 1977;54(12):587-591
35. Monis PT., Giglio S., Saint CP. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Anal Biochem* 2005; 340: 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.01.046>
36. Moussa HB, Pédrón J, Bertrand C, Hecquet A, Barny MA. *Pectobacterium quasiaquaticum* sp. nov., isolated from waterways. *Int J Syst Evol Microbiol* 2021; 70(10). <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.005042>
37. Motyka-Pomagruk A, Zoledowska S, Sledz W, Lojkowska E. The occurrence of bacteria from different species of *Pectobacteriaceae* on seed potato plantations in Poland *Eur J Plant Pathol* 2021;159:309–325. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02163-x>
39. Nabhan S, De Boer SH, Maiss E, Wydra K. Taxonomic relatedness between *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* subsp. nov. *J Appl Microbiol* 2012;113:904–13. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05383.x>.
40. Nabhan S, De Boer SH, Maiss E, Wydra K. *Pectobacterium aroidearum* sp. nov., a soft rot pathogen with preference for monocotyledonous plants. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013;63:2520–5. <http://dx.doi.org/10.1099/ijms.0.046011-0>.
41. Ni L, Guo L, Custers JBM, Zhang L. Characterization of calla Lily soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ZT0505 bacterial growth and pectate lyase activity under different conditions. *J Plant Pathol* 2010;92:421–8. <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V92I2.186>.
42. Nykyri J, Fang X, Dorati F, Bakr R, Pasanen M, Niemi O, Palva ET, Jackson RW, Pirhonen M. Evidence that nematodes may vector the soft rot-causing enterobacterial phytopathogens. *Plant Pathol* 2014; 63:747–757. <https://doi.org/10.1111/ppa.12159>.
43. Oulghazi S, Cigna J, Lau YY, Moumni M, Chan KG, *et al.* Transfer of the waterfall source isolate *Pectobacterium carotovorum* M022 to *Pectobacterium fontis* sp. nov., a deep-branching species within the genus *Pectobacterium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2019;69:470–475. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.003180>.
44. Parkinson N, DeVos P, Pirhonen M, Elphinstone J. *Dickeya aquatica* sp. nov., isolated from waterways. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;64:2264–6. <http://dx.doi.org/10.1099/ijms.0.058693-0>.
45. Pasanen M, Waleron M, Schott T, Cleenwerck I, Misztak A, Waleron K, Pritchard L, Bakr R, Degefu Y, van der Wolf J, et al. *Pectobacterium parvum* sp. nov., Having a *Salmonella* SPI-1-like Type III Secretion System and Low Virulence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 2020;70:2440–2448. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.004057>.
46. Pedron J, Bertrand C, Taghouti G, Portier P, Barny MA, *Pectobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from waterways. *Int J Syst Evol Microbiol* 2019;69:745–751. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.003229>.
47. Pitman AR, Wright PJ, Galbraith MD, Harrow SA. Biochemical and genetic diversity of pectolytic enterobacteria causing soft rot disease of potatoes in New Zealand. *Australasian Plant Pathology* 2008;37:559–568. <https://doi.org/10.1071/AP08056>.
48. Portier P, Pédrón J, Taghouti G, Fischer-Le Saux M, Caullireau E, Bertrand C, Laurent A, Chawki K, Oulgazi S, Moumni M, et al. Elevation of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Odoriferum* to Species Level as *Pectobacterium odoriferum* sp. nov., Proposal of *Pectobacterium brasiliense* sp. nov. and *Pectobacterium actinidiae* sp. nov., Emended Description of *Pectobacterium carotovorum* and Description of *Pectobacterium versatile* sp. nov., Isolated from Streams and Symptoms on Diverse Plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2019;69:3207–3216. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003611>.
49. Potrykus M, Golanowska M, Sledz W, Zoledowska S, Motyka A, Kolodziejska A, Lojkowska E. Biodiversity of *Dickeya* spp. isolated from potato plants and water sources in temperate climate. *Plant Dis* 2016;100:408–17. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-15-0439-RE>.
50. Robert-Baudouy J, Nasser W, Condemine G, Reverchon S, Schevchik V, Hugouvieux-Cotte-Pattat N. Pectic enzymes of *Erwinia chrysanthemi*: regulation and role in pathogenesis. In: *Plant Microbe Interactions*. Eds G. Stacey and N. Keen, American Phytopathological Society Press 2000;5: 221-268.

51. Rungnapha K, Yu SH, Xie GL. Bacterial Stem Rot of Poinsettia Caused by a *Dickeya* sp. (*Pectobacterium chrysanthemi*) in China. *Plant Disease*. APS 2008;92(7): 1135-1135. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-7-1135B>
52. Samson R, Legendre JB, Christen R, Fischer-Le Saux M, Achouak W, Gardan L. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al., 1953) Brenner I. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;55:1415–27. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.02791-0>.
53. Sarfraz S, Riaz K, Oulghazi S, Cigna J, Sahi ST, Khan SH, Faure D. *Pectobacterium punjabense* sp. nov., Isolated from Blackleg Symptoms of Potato Plants in Pakistan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018, 68, 3551–3556. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003029>.
54. Slawiak M, Lojkowska E, van der Wolf JM. First report of bacterial soft rot on potato caused by *Dickeya* sp: (syn. *Erwinia chrysanthemi*) in Poland. *Plant Pathol* 2009;58:794. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02028.x>.
55. Sledz W, Jafra S, Waleron M, Lojkowska E. Genetic diversity of *Erwinia carotovora* strains isolated from infected plants grown in Poland. *EPPPO Bull* 2000;30:403–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2000.tb00919.x>.
56. Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA. Approved lists of bacterial names. *Int. J. syst. Bact.* 1980;30:225–420.
57. Tian Y, Zhao Y, Yuan X, Yi J, Fan J, Xu Z, Hu B, De Boer SH, Li X. *Dickeya fangzhongdai* sp. nov., a plant-pathogenic bacterium isolated from pear trees (*Pyrus pyrifolia*). *Int J Syst Evol Microbiol* 2016;66:2831–2835. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001060>.
58. Toth IK, van der Wolf JM, Saddler G, Lojkowska E, Hélias V, Pirhonen M, et al. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathol* 2011;60:385–99. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02427.x>.
59. Tsror L, Erlich O, Lebiush S, Hazanovsky M, Zig U, Slawiak M, et al. Assessment of recent outbreaks of *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) slow wilt in potato crops in Israel. *Eur J Plant Pathol* 2009;123:311–20. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-008-9368-0>.
60. van der Waals J, doniesienie ustne EUPHRESCO Workshop, Gdańsk 2015.
61. van der Wolf J, Kastelein P. The role of haulm infections in the epidemiology of soft rot Enterobacteriaceae. The 3rd International *Erwinia* Workshop on soft rot Enterobacteriaceae and related organisms 2014. p. 7, S1–K1.
62. van der Wolf JM, Nijhuis EH, Kowalewska MJ, Saddler GS, Parkinson N et al. *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plantpathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;64:768–774. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.052944-0>.
63. Waleron, M, Misztak A, Waleron M, Franczuk M, Wielgomas B, Waleron K. Transfer of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Strains Isolated from Potatoes Grown at High Altitudes to *Pectobacterium peruviane* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 2018b;41:85–93. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.11.005>
64. Waleron M, Misztak A, Waleron M, Jonca J, Furmaniak M, Waleron K. *Pectobacterium polonicum* sp. nov. Isolated from Vegetable Fields. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2019;69:1751–1759. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003387>
65. Waleron M, Misztak A, Waleron M, Franczuk M, Jonca J, Wielgomas B, Mikicinski A, Popovic T, Waleron K. *Pectobacterium zantedeschiae* sp. nov. a New Species of a Soft Rot Pathogen Isolated from Calla Lily (*Zantedeschia* spp.). *Syst. Appl. Microbiol.* 2019a;42:275–283. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.08.004>
66. Waleron M, Waleron K, Lojkowska E. Occurrence of *Pectobacterium wasabiae* in potato field samples. *Eur J Plant Pathol* 2013;137:149–58. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-013-0227-2>.
67. Waleron M, Waleron K, Lojkowska E. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* causing soft rot of stored vegetables. *Eur J Plant Pathol* 2014;139:457–69. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-014-0403-z>.
68. Waleron M, Waleron K, Lojkowska E. First Report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing soft rot on potato and other vegetables in Poland. *Plant Dis* 2015;99:1271. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-02-15-0180-PDN>.
69. Waleron K, Waleron M, Podhajska AJ, Lojkowska E. Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a *recA* gene fragment. *Microbiology* 2002;148:583–95. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-148-2-583>.

70. Wang X, He SW, Guo HB, Han JG, Thin kk, Gao Js, Wang Y, Zhang XX. *Dickeya oryzae* sp. nov., isolated from the roots of rice. *Int J Syst Evol Microbiol* 2020;70:4171–4178. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004265>.
 71. Wallace A, Pérombelon MCM. Haemagglutinins and fimbriae of soft rot *Erwinias*. *J Appl Bacteriol* 1992;73:114–9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb01696.x>.
 72. Wegrzyn G, Kwasnik E, Taylor K (1991) Replication of λ plasmid in amino acid-starved strains of *Escherichia coli*. *Acta Biochim Pol* 38: 181–186.
 73. Zoledowska S, Motyka A, Zukowska D, Sledz W, Lojkowska E. Population Structure and Biodiversity of *Pectobacterium parmentieri* Isolated from Potato Fields in Temperate Climate. *Plant Dis* 2018; 102(1):154-164. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-17-0761-RE>.
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Moja aktywność naukowa realizowana poza jednostką macierzystą została zrealizowana w instytucji Laboratory of Mycology and Bacteriology, Plant Research International, Wageningen, Holandia (obecnie Wageningen University and Research, Bioscience Department) we współpracy z dr Janem van der Wolfem (pracowałem w tej jednostce przez 6 miesięcy w latach 2005 i 2006).

Podczas odbytych staży naukowych uczestniczyłem w badaniach koncentrujących się na zastosowaniu cytometrii przepływowej oraz jej odmiany (Luminex xMAP®) do szybkiego wykrywania bakteryjnych patogenów w materiale roślinnym. Przeprowadzone przez mnie badania doprowadziły m.in. do opracowania procedury przygotowania materiału roślinnego do analizy w cytometrze przepływowym. Dzięki temu możliwe było opisanie metody wykrywania i identyfikacji żywych komórek patogennych bakterii *Ralstonia solanacearum* na poziomie około 10^2 jtk mL⁻¹. Natomiast w przypadku zastosowania technologii Luminex xMAP® moje badania były ukierunkowane na wykrywanie bakterii *Pectobacterium atrosepticum* (Pca) i *Dickeya dianthicola* (Dcd). W oparciu o tę technologię opracowaliśmy test immunologiczny na mikrosferach (MIA) pokrytych przeciwciałami o różnych kolorach i drugorzędowymi przeciwciałami skoniugowanymi z Alexa Fluor® 532 (tzw. barwnikiem reporterowym), w celu jednoczesnego wykrywania *Pectobacterium atrosepticum* (Pca) i *Dickeya dianthicola* (Dcd) w ekstraktach z roślin ziemniaka.

Wyniki tych badań zostały opublikowane w trzech publikacjach (podano w: Wykaz osiągnięć naukowych stanowiących znaczny wkład w dyscyplinę biotechnologia/ Wykaz opublikowanych monografii naukowych/rozdziałów w monografii (Po uzyskaniu stopnia doktora) pozycja 5; Wykaz opublikowanych artykułów w czasopismach naukowych (Po uzyskaniu stopnia doktora) pozycja: 21 i 22) oraz czterech doniesieniach konferencyjnych jako prezentacje i postery (**podano w: Wykaz osiągnięć naukowych stanowiących znaczny wkład w dyscyplinę biotechnologia (Po uzyskaniu stopnia doktora)/Konferencje krajowe** pozycja 24, **Konferencje międzynarodowe** pozycja: 29, 30, 33).

Moja istotna aktywność naukowa realizowana w więcej niż jednej uczelni krajowej jest związana także z wieloletnią współpracą z zespołem badawczym Katedry Chemii Analitycznej i Metalurgii Chemicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Badania, które realizuję z tym zespołem dotyczą zastosowania bezpośredniego lub pośredniego różnych typów zimnych plazm m.in. w:
- ochronie roślin uprawnych celem eradykacji fitopatogenów bakteryjnych,

- ochronie roślin celem uzyskiwania roztworów post-plazmowych wykorzystywanych do eradykacji bakterii patogennych i stymulacji wzrostu roślin uprawnych,
- syntezie nanostruktur do eradykacji patogenów bakteryjnych,
- inaktywacji antybiotyków i związków endokrynnie czynnych w ochronie środowiska,
- weterynarii celem eradykacji bakterii wywołujących choroby skóry.

Wyniki tych badań zostały opublikowane w 8 publikacjach oraz w jednym rozdziale w monografii. (**podano w:** *Wykaz opublikowanych artykułów w czasopismach naukowych (Po uzyskaniu stopnia doktora)* pozycja: 1, 3, 6, 8, 11, 12; *Wykaz opublikowanych monografii naukowych/rozdziałów w monografii* pozycja 3) Dwie publikacje wchodziły w skład osiągnięć naukowych przedstawionych w ramach postępowania habilitacyjnego: publikacja H8, H9.

Badania nad wykorzystaniem zimnej plazmy zaowocowały również uzyskaniem 5 patentów oraz 5 zgłoszeniami patentowymi, które wskazałem w *Wykaz osiągnięć naukowych stanowiących znaczny wkład w dyscypliny biotechnologia/ Wykaz uzyskanych praw własności przemysłowej, w tym uzyskanych patentów krajowych lub międzynarodowych* pozycja: 1, 2, 4, 5, 6; *Zgłoszenia patentowe* pozycja: 1, 2, 3, 4, 5)

Obecnie moja współpraca z powyższym zespołem prowadzona jest w ramach dwóch grantów NCN (w projekcie Opus 17 jestem kierownikiem grantu, w projekcie Sonata 15 kierownikiem ze strony partnera czyli UG).

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Dydaktyka

Działalność dydaktyczną na MWB UG i AMG (obecnie GUMed) rozpocząłem w 1994 roku od prowadzenia wykładów i ćwiczeń z przedmiotów „Podstawy biologii molekularnej” oraz „Podstawy mikrobiologii z elementami ochrony środowiska” dla studentów Biotechnologii MWB UG i GUMed oraz studentów Wydziału Chemii UG. Od 2010 roku do chwili obecnej prowadzę wykłady i ćwiczenia z przedmiotu Inżynieria Bioprocessowa (od 2022 w ramach Bloku: „Biotechnologia w przemyśle i rolnictwie - Bio-Technologie-Fundamenty”) dla studentów kierunku Biotechnologia MWB UG i GUMed oraz wykłady i ćwiczenia z przedmiotu Biotechnologia dla studentów Wydziału Chemii UG. Od roku 2021 prowadzę również wykłady z częścią praktyczną z przedmiotu Inżynieria Leków w Bloku: „Biotechnologia w medycynie - Terapie i technologie” dla studentów kierunku Biotechnologia MWB UG i GUMed. W roku 2010 zostałem nominowany w formie głosowania przez studentów Naszego wydziału do konkursu „Najlepszego Wykładowcy MWB UG i GUMed”.

W ramach prowadzonej działalności dydaktycznej byłem promotorem 20 prac dyplomowych magisterskich, recenzentem 15 prac magisterskich oraz promotorem i recenzentem prac dyplomowych licencjackich.

W latach 2015-2019 byłem promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim mgr Sabiny Elżbiety Żołędowskiej pt. „Charakterystyka bioróżnorodności i pan-genomu bakteryjnych patogenów roślin z gatunku *Pectobacterium parmentieri*” (praca została obroniona z wyróżnieniem w dniu 24 maja 2019 roku). Promotor w przewodzie doktorskim: prof. dr hab. Ewa Łojkowska, Kopromotor: prof. Alessio Mengoni, Promotor pomocniczy: dr inż. Wojciech Śledź, Recenzenci: prof. dr hab. Katarzyna Brzostek, dr hab. Andrzej Mazur, prof. UMCS.

Również w latach 2015-2019 roku byłem promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim mgr Agaty Motyki-Pomagruk pt. „Charakterystyka genotypowa i fenotypowa bakterii z gatunku *Dickeya solani* oraz opracowanie nowatorskich metod

ochrony roślin przed patogenami bakteryjnymi” (praca została obroniona z wyróżnieniem w dniu 20 września 2019 roku), Promotor w przewodzie doktorskim: prof. dr hab. Ewa Łojkowska, Kopromotor: prof. Alessio Mengoni, Promotor pomocniczy: dr inż. Wojciech Śledź, Recenzenci: dr hab. Monika Beata Janczarek, prof. UMCS, prof. dr hab. Katarzyna Dorota Lisowska.

Obie rozprawy doktorskie zostały wyróżnione przez Radę MWB UGi GUMed a dr Agata Motyka-Pomagruk uzyskała dodatkowo Nagrodę Prezesa Rady Ministrów za wyróżniającą się rozprawę doktorską (2020).

Prace Organizacyjne

W czasie mojej pracy na MWB UG i GUMed angażowałem się w prace związane z organizacją Naszego wydziału:

- w latach 1994-2002 oraz 2004-2008 byłem członkiem Rady MWB UG i GUMed,
- w latach 1996-1998, brałem udział w pracach Komisji ds. Socjalno-Bytowych Pracowników UG,
- latach 2000-2002, pracowałem w Komisji ds. Wykroczeń Pracowników Dydaktyczno-Naukowych UG,
- w latach 2005-2008, pracowałem w zespole Komisji Wykroczeń ds. Studentów UG oraz Komisji ds. Internetowej Rekrutacji Kandydatów UG,
- w latach 2012-2016 aktywnie uczestniczyłem w pracach komisji ds. projektowania i nadzoru nad budową budynku Instytutu Biotechnologii UG. Za zaangażowanie w pracę wraz z pozostałymi członkami komisji otrzymałem Nagrodę Rektora UG stopnia I w roku 2016.

Od roku 2017 od chwili obecnej jestem przewodniczącym Komisji ds. GMO i GMM na MWB UG i GUMed. Dzięki naszym staraniom MWB UG i GUMed uzyskało zezwolenie na prowadzenie zakładów inżynierii genetycznej GMM i GMO kat. II. W obecnej chwili prowadzimy prace w kierunku uzyskania zgody na prowadzenie zakładu inżynierii genetycznej GMM kat. III.

W roku 2013 byłem współzałożycielem pierwszej spółki typu spin-off Uniwersytetu Gdańskiego produkującej płynne drożdże piwowskie. Swoją działalność w spółce Fermentum Mobile jako osoba odpowiedzialna za kolekcję szczepów drożdży realizowałem w latach 2013-2018.

Od roku 2016 do chwili obecnej jestem kierownikiem ds. technicznych w Laboratorium Badawczo-Wdrożeniowym (LB-W) MWB UG i GUMed. Wysiłkiem, kierowanego przeze mnie zespołu w roku 2018 wprowadziliśmy w LB-W system zarządzania jakością zgodny z normą PN-EN ISO/IEC 17025:2018-02 potwierdzający kompetencje laboratoriów badawczych i wzorcujących. W roku 2020 jako pierwszy w historii Uniwersytetu Gdańskiego i do tej chwili jedyny zespół LB-W MWB UG i GUMed uzyskał akredytację od Polskiego Centrum Akredytacji (AB 1760). Natomiast w roku 2023 zespół przeprowadził akredytację wprowadzonego systemu zarządzania środowiskowego zgodnego z normą ISO 14001.

Uzyskane certyfikaty oprócz potwierdzenia kompetencji naszego zespołu oraz działań zgodnych z najlepszą praktyką laboratoryjną w znaczący sposób wpływają na lepsze kontakty i współpracę z przemysłem oraz efektywność wspólnie realizowanych projektów.

Popularyzacja nauki i sztuki

W latach 2003-2012 byłem głównym koordynatorem Bałtyckiego Festiwalu Nauki na MWB UG i GUMed. Za zaangażowanie w organizację powyższej imprezy

otrzymałem wraz z zespołem pomocniczym Nagrodę Rektora UG I stopnia w roku 2011.

W latach 2012-2015 byłem głównym koordynatorem Nocy Biologów na MWB UG i GUMed.

W roku 2017 zorganizowałem interaktywne stanowisko „Bioreaktor” w ramach „Nocy Biologów 2017”

Opiekowałem się studentami w Kole Naukowym BioMed na MWB UG i GUMed jako opiekun pomocniczy w latach 2013-2015. W tym okresie zostały zrealizowane dwa projekty:

- projekt kryminalistyczny "Określanie pokrewieństwa z użyciem analizy DNA"- cykl spotkań 4-godzinnych (nauka: pobierania prób, izolacji DNA, metody PCR, elektroforezy, analizy wyników),

- projekt biotechnologiczny: „Biopaliwa” (cykl spotkań 4-godzinnych): ekstrakcja olejów z nasion roślin oleistych oraz otrzymywanie estrów (bio-diesel), określenie jakości otrzymanego paliwa z użyciem metod przemysłowych.

W ramach współpracy, którą nawiązałem z Publicznym Gimnazjum nr 2 im. Jana Heweliusza w Żukowie, uczniowie wraz z nauczycielką - opiekunką mgr Anną Borowicz, uczestniczyli w powyższych projektach. Uczniowie gimnazjum w aktywny sposób uczestniczyli w Nocy Biologów organizując pod moją opieką wspólne stanowisko naukowe ze studentami MWB UG i GUMed w latach 2013-2015.

W latach 2003-2017 prowadziłem wykłady popularno-naukowe pt. „Geny w jadłospisie” w ramach Gdańskiego Uniwersytetu Trzeciego Wieku.

W latach 2014-2015 sprawowałem opiekę dydaktyczno-naukową nad uczennicą Sarą Berent z III LO w Gdyni (od 2015 roku studentka UG) w ramach programu „Opieka na uczniami zdolnymi”. Jej projekt badawczy był realizowany w Zakładzie Ochrony i Biotechnologii Roślin MWB UG i GUMed pod moją opieką i dotyczył wpływu olejków eterycznych na wybrane mikroorganizmy bakteryjne i grzybowe.

Uzyskane wyniki badań pozwoliły Sarze Berent na:

- zakwalifikowanie się do półfinału konkursu E(x)plory 2015, Toruń: nagrodą było zakwalifikowanie się uczestniczki do finału E(x)plory w Gdyni,
- zdobycie w finale konkursu E(x)plory 2015 Gdynia 2015 Nagrody Specjalnej tj. akredytacji na udział w INESPO w Amsterdamie,
- zdobycie w konkursie INESPO 2105 Amsterdam: I Nagrody (złoty medal i statuetka za najlepszy projekty badawczy),
- zakwalifikowanie się do Specjalnej Edycji E(x)plory 2015 w Warszawie,
- zdobycie w konkursie EUCYS 2015 Warszawa: II Nagrody (awans do konkursu EUCYS 2015 w Mediolanie),
- zdobycie w konkursie EUCYS 2015 w Mediolanie: I Nagrody “EXPO donated prize European Union Competition for Young Scientists 2015”,
- promocję do Finalist of Expo Sciences Europe Forum Toulouse 2016.

Od roku 2013 do chwili obecnej jako wiceprezes Towarzystwa Polsko-Izraelskiego MORESHET MESHUTEFET w Gdańsku, jestem współzałożycielem i współorganizatorem Przeglądu Filmów o Tematyce Żydowskiej „Shalom Polin” na Uniwersytecie Gdańskim, przekształconego w Gdański Festiwal Kultury Żydowskiej organizowany na Uniwersytecie Gdańskim (lata: 2013-2018, 2021-2023).

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

Nagrody i wyróżnienia otrzymane za działalność naukową i organizacyjną:

- 2022, Srebrny medal za wynalazek (współtwórca): "Method of deactivation of endocrine active compounds from aqueous solutions" (zgłoszenie patentowe do UP RP nr Pat. 438832) na International Warsaw Invention Show,
- 2022, Nagroda Główna konkursu Eureka Dziennik Gazeta Prawna Edycja IX za wynalazek (współautor): "Sposób dezaktywacji antybiotyków w roztworach wodnych",
- 2020, Wyróżnienie za wynalazek (współtwórca): „Sposób eradykacji bakteryjnych fitopatogenów” opierający się o wykorzystanie roztworów aktywowanych zimną plazmą atmosferyczną do zwalczania bakterii powodujących choroby roślin w VII edycji konkursu Eureka! Dziennik Gazeta Prawna,
- 2020, Wyróżnienie za wynalazek (współtwórca): „Sposób otrzymywania preparatu do stymulacji wzrostu roślin, preparat otrzymany tym sposobem oraz zastosowanie preparatu do stymulacji wzrostu roślin, w szczególności tych istotnych gospodarczo”. Nagroda specjalna Prezesa Urzędu Patentowego RP na X jubileuszowej edycji Konkursu „Student-Wynalazca” organizowanej przez Politechnikę Świętokrzyską (zgłoszenie patentowe w UPRP P.430866),
- 2018, Nagroda Rektora UG: Nagroda zespołowa I stopnia za wdrożenie systemu zarządzania jakością zgodnego z normą PN-EN ISO/IEC 17025:2005 w Laboratorium Badawczo-Wdrożeniowym MWB UG i GUMed,
- 2016, Nagroda Rektora UG: Nagroda zespołowa I stopnia za wyróżniające wyniki w kierowaniu jednostkami organizacyjnymi i tworzeniu warsztatu dydaktycznego UG,
- 2015, Nagroda Rektora UG: Nagroda zespołowa I stopnia za 6 publikacji opublikowanych w 2014 roku na temat poznania mechanizmów warunkujących patogeniczność bakteryjnych patogenów roślin z rodzaju *Dickeya* i *Pectobacterium*,
- 2014, Nagroda Best Poster Award na 11th Conference EFPP "Healthy Plants – healthy people " za poster "Monitoring of pectinolytic bacteria originating from potato (*Solanum tuberosum* L.) plants and water samples" sesja: Pathogen identification, detection and monitoring (Motyka M., Śledź W., Potrykus M., Golanowska M., Żołędowska S., Butrymowicz J., Kołodziejka A., Czajkowski R., Łojkowska E. Kraków, 8-13 września 2014,
- 2011, Nagroda Rektora UG : Nagroda zespołowa I stopnia za wieloletnie kierowanie organizacją Festiwalu Nauki w MWB UG i GUMed,
- 2010, Nagroda Rektora SGGW w Warszawie w roku 2010: Nagroda zespołowa Rektora SGGW za współautorstwo w opracowaniu kolejnej edycji podręcznika akademickiego "Biotechnologia roślin" PWN.
- 2002, Wyróżnienie rozprawy doktorskiej przez Radę Wydziału MWB UG i AMG (obecnie GUMed)
- 2001, Stypendium Holenderskiego Ministerstwa Rolnictwa i Rybactwa.



.....
(podpis wnioskodawcy)