

## Autoreferat w języku polskim

**1. Imię i Nazwisko:** Włodzimierz Grzegorz Przewodowski

**2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:**

- **16.06.2001** Politechnika Koszalińska, Wydział Mechaniczny, Koszalin  
Tytuł magistra inżyniera Inżynierii Żywności  
Praca magisterska pod kierunkiem dr hab. Jerzego Lewosza, pt:  
"Identyfikacja jednorodności i tożsamości odmianowej ziemniaka przy pomocy markerów biochemicznych i genetycznych".
- **17.09.2007** Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików  
Stopień naukowy doktora nauk rolniczych w zakresie agronomii.  
Praca doktorska pod kierunkiem dr hab. Jerzego Lewosza, pt:  
"Opracowanie zestawów diagnostycznych do wykrywania bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* - sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka". Recenzenci: Prof. Dr hab. Ewa Łojkowska, Prof. Dr hab. Piotr Sobiczewski.

**Inne posiadane dyplomy**

- **23.10.2003** Politechnika Koszalińska, Wydział Mechaniczny, Koszalin  
Podyplomowe Studium Pedagogiczne.

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:**

- **01.09.2001 - 30.06.2005** Studia doktoranckie w Katedrze Mikrobiologii (01.09.2001 – 30.11.2002) i Katedrze Biochemii i Biotechnologii (01.12.2002 – 30.06.2005) Wydział Mechaniczny Politechnika Koszalińska.
- **07.06.2004 - 06.05.2005** Staż naukowy w Laboratorium Modyfikacji Membran. Dział Badań i Rozwoju. Oddział Biotechnologii. Sartorius AG, Goettingen, Niemcy.
- **01.09.2001 - 15.01.2006** Stażysta - wolontariusz, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka (IHAR ZNiOZ) w Boninie.
- **16.01.2006 - 31.12.2006** Inżynier stażysta, IHAR ZNiOZ w Boninie.
- **01.01.2007 - 31.12.2007** Inżynier, IHAR ZNiOZ w Boninie.
- **01.01.2008 - 31.10.2009** Asystent, IHAR ZNiOZ w Boninie.
- **01.11.2009 - obecnie** Adiunkt, IHAR - PIB, Oddział w Boninie.

**4. Wskazanie przedstawionego do oceny osiągnięcia naukowego, wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):**

**a) Tytuł osiągnięcia naukowego**

**„Opracowanie metod izolacji i identyfikacji wybranych, bakteryjnych patogenów kwarantannowych ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.)”.**

## **b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:**

Osiągnięcie naukowe stanowi jednotematyczny cykl prac obejmujących jedną publikację umieszczoną w bazie danych JCR oraz 3 publikacje w formie patentów znajdujących się bazach patentowych o łącznym IF=3,353, punkty MNiSW<sub>Rok uzyskania publikacji/przyznania patentu</sub> = 110 pkt, MNiSW<sub>2016</sub> = 125 pkt. Oświadczam, że w przedstawionych pracach opisane badania były moją autorską koncepcją, we wszystkich pracach byłem pomysłodawcą, autorem tekstu, autorem korespondencyjnym i głównym wykonawcą badań. Przedstawione prace podlegały rygorystycznej weryfikacji przez recenzentów publikacji oraz asesorów patentowych w celu spełnienia szczegółowych wymagań dotyczących odpowiednio czasopism naukowych oraz oryginalności opracowanych rozwiązań na skalę światową. Swoją udział w powstaniu i opublikowanie przedstawionej publikacji i patentów oceniam odpowiednio na 80 i 100%.

**H1 Przewodowski W., Przewodowska A. 2017. Development of a Sensitive and Specific Polyclonal Antibody for Serological Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. PLoS ONE 12(1):e0169785. doi:10.1371/journal.pone.0169785. [IF=3,535; MNiSW<sub>2016</sub>=35pkt]**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i wykonaniu eksperymentów, opracowaniu sposobu przygotowania antygeny, immunizacji zwierząt, oczyszczaniu oraz ocenie jakości uzyskanych przeciwciał poliklonalnych, analizie i interpretacji wyników, współudziale w przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.*

**H2 Przewodowski W. 2013. Sposób wykrywania obecności bakterii *Cms* z wykorzystaniem membran poliwęglanowych zawierających immobilizowane przeciwciała. Patent UP RP nr PL 213857. [IF<sup>1</sup>; MNiSW<sub>2013</sub>=25pkt, MNiSW<sub>2016</sub>=30pkt]**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na określeniu koncepcji wynalazku, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń związanych z potwierdzeniem przyjętej hipotezy, analizie i interpretacji wyników badań, napisaniu zgłoszenia patentowego oraz przygotowaniu odpowiedzi na uwagi asesorów patentowych. Mój udział procentowy szacuję na 100%.*

**H3 Przewodowski W. 2013. Zestaw inkubacyjny do wykrywania albo przyżyciowego izolowania wybranych bakterii, *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Patent UP RP nr PL 213856. [IF<sup>1</sup>; MNiSW<sub>2013</sub>=25pkt, MNiSW<sub>2016</sub>=30pkt]**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na określeniu koncepcji wynalazku, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń związanych z potwierdzeniem przyjętej hipotezy, analizie i interpretacji wyników badań, napisaniu zgłoszenia patentowego oraz przygotowaniu odpowiedzi na uwagi asesorów patentowych. Mój udział procentowy szacuję na 100%.*

**H4 Przewodowski W. 2013. Zestaw do wykrywania albo przyżyciowego izolowania bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w analizowanej próbce. Patent UP RP nr PL 213855. [IF<sup>1</sup>; MNiSW<sub>2013</sub>=25pkt, MNiSW<sub>2016</sub>=30pkt]**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na określeniu koncepcji wynalazku, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń związanych z potwierdzeniem przyjętej hipotezy, analizie i interpretacji wyników badań, napisaniu zgłoszenia patentowego oraz przygotowaniu odpowiedzi na uwagi asesorów patentowych. Mój udział procentowy szacuję na 100%.*

<sup>1</sup> Z uwagi na brak oddziaływania współczynnika IF na patenty, w pozycjach dotyczących patentów nie zamieszczano jego wartości.

**c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

**Wstęp**

Ziemniak jako jedna z najważniejszych strategicznie roślin uprawnych na świecie, ma również bardzo ważne znaczenie gospodarcze i ekonomiczne dla Polski. Polska pod względem powierzchni i zbiorów ziemniaka zajmuje drugie miejsce w Europie i siódme na świecie (FAOSTAT 2017, <http://faostat3.fao.org>). Wegetatywny sposób rozmnażania ziemniaka, powoduje że jest to roślina szczególnie narażona na infekcje, wywoływane przez licznie występujące w środowisku glebowym patogeny bakteryjne, wirusowe i grzybowe. Za szczególnie istotne dla upraw ziemniaka uznaje się choroby kwarantannowe, a wśród nich bakteriozę pierścieniową ziemniaka powodowaną przez jednego z najważniejszych i jednocześnie najbardziej uciążliwych patogenów ziemniaka – bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) (Spickermann et Kotthoff) Davis et al. (Lee i in., 1997; Lebecka i Zimnoch-Guzowska 2005; OEPP/EPPO 2006). Bakteria Cms znajduje się na liście A2 EPPO organizmów kwarantannowych z zerową tolerancją (EPPO, <https://www.eppo.int/QUARANTINE/listA2.htm>). Wykrycie i potwierdzenie porażenia już w jednej bulwie/roślinie skutkuje nie tylko dyskwalifikacją plantacji i koniecznością utylizacji materiału roślinnego, ale również nałożeniem restrykcji fitosanitarnych na miejsce produkcji. W praktyce oznacza to kłopoty finansowe czasami prowadzące do bankructwa gospodarstwa. Wprowadzenie urzędowych regulacji fitosanitarnych dotyczących bakteriozy pierścieniowej stało się główną przyczyną drastycznego zmniejszenia eksportu ziemniaków z Polski oraz spowodowało powstanie tzw. bariery podażowej w produkcji nasiennej (Chotkowski i Rembeza, 2013). Wystąpienie w latach siedemdziesiątych epidemii bakteriozy pierścieniowej w Ameryce Północnej i Rosji spowodowało straty plonu sięgające około 50% i związane z tym ogromne straty ekonomiczne (Muller i Ficke, 1974; Easton, 1979). Roczne straty gospodarcze w Unii Europejskiej wynikające z działań dotyczących eliminacji bakterii Cms oraz wypłaty odszkodowań oszacowano na poziomie 15 milionów euro (Van der Volf i in., 2005).

Polska ze względu na duże rozdrobnienie gospodarstw oraz niską wymianę materiałów nasiennych należy do krajów o najwyższym współczynniku porażenia bakteriozą pierścieniową. Na podstawie analizy krajowych wykryć bakterii Cms przez jednostki Państwowego Inspektoratu Ochrony Roślin i Nasiennictwa (PIORIN) stwierdzonych w latach 2011-2015, wykazano obecność tej groźnej bakterii we wszystkich województwach (Raport

PIORIN za lata 2011 - 2015). Od momentu wejścia Polski do Unii Europejskiej i związaną z tym koniecznością przestrzegania surowych norm fitosanitarnych dotyczących zdrowotności ziemniaka, problem występowania Cms w Polsce jest coraz mocniej akcentowany na arenie międzynarodowej. W opinii PIORiN, podwyższona wykrywalność sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka w Polsce jest dostrzegana przez Stały Komitet ds. Zdrowia Roślin przy Komisji Europejskiej w Brukseli. Zwrócono uwagę, iż stopień porażenia ziemniaków przez Cms w 2011 r. wynosił w naszym kraju ok. 12%. Była to liczba wykryć bez mała 10-krotnie większa niż średnia wykryć Cms w pozostałych 26 państwach UE. Według najnowszego raportu Dyrekcji Generalnej UE ds. Zdrowia i Bezpieczeństwa Żywności, Polska jest nadal postrzegana jako kraj o najwyższym stopniu zanieczyszczenia bakterią pierścieniową w UE (Raport DG UE 2016/17). Sytuacja ta skutkuje brakiem zaufania do polskiego producenta ziemniaka oraz wzmożonymi kontrolami materiału sadzeniowego eksportowanego do państw UE.

Bakterie Cms pod względem taksonomicznym stanowią jeden pięciu podgatunków gatunku *Clavibacter michiganensis* (*C.m. insidiosus*, *C.m. michiganensis*, *C.m. nebraskensis*, *C.m. sepedonicus* i *C.m. tessellarius*), będących wysoko wyspecjalizowanymi patogenami różnych gatunków roślin. Na podstawie najnowszych badań molekularnych polegających na analizie genomów oraz identyfikacji metodą MLSA (ang. Multi Locus Sequence Analysis, sekwencjonowanie wielu genów metabolizmu podstawowego) poszczególnych podgatunków *C. michiganensis*, zaproponowano wyodrębnienie sprawcy bakteriozy pierścieniowej jako odrębnego gatunku *Clavibacter sepedonicus* comb. nov. (Li i in., 2018).

Sprawca bakteriozy pierścieniowej ziemniaka posiada szereg unikalnych cech, które stwarzają wysokie ryzyko niekontrolowanego rozprzestrzeniania się tej choroby na nowe obszary. Podobnie jak wiele innych podgatunków *Clavibacter michiganensis*, bakterie Cms często wywołują bezobjawową (latentną) formę choroby (De Boer i in., 2005; OEPP/EPPO, 2006). Niska koncentracja bakterii Cms w tkankach, jak również tolerancyjność niektórych odmian ziemniaka, skutkuje brakiem widocznych objawów infekcji w roślinach, przez co stanowi zagrożenie porażeniem na szeroką skalę nawet przez kilka sezonów wegetacyjnych (Pastuszewska i in., 2010). Kłopotliwa do zdiagnozowania jest również pełnoobjawowa postać choroby, która uwidacznia się zazwyczaj pod koniec okresu wegetacji lub dopiero w trakcie przechowywania bulw i często mylona jest z objawami innych chorób (Dyrektywa Komisji WE 2006/56; Przewodowski i Treder, 2008).

Najskuteczniejszym sposobem ochrony przed bakterią pierścieniową jest stosowanie zdrowego, kwalifikowanego materiału sadzeniowego, szybka likwidacja ognisk

chorobowych oraz stosowanie higieny w całym procesie produkcji i przechowywania ziemniaka. W każdym z tych przypadków konieczna jest szybka i wiarygodna diagnostyka potwierdzająca czystość fitosanitarną materiału sadzeniakowego i miejsca produkcji. Specyfika sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka sprawia jednak, że diagnostyka patogenu stwarza wiele trudności. **Nie ma obecnie jednej metody diagnostycznej, która w sposób jednoznaczny i wiarygodny potwierdzałyby obecność i patogeniczność bakterii Cms w próbach pobranych ze środowiska.** Zgodnie z przyjętymi wymogami fitosanitarnymi dla przeprowadzenia wiarygodnej diagnostyki Cms należy stosować przynajmniej dwa testy przesiewowe oparte na różnych zasadach biologicznych łącznie z testem patogeniczności na roślinie bioindykatorowej (OEPP/EPPO, 2006).

Podstawowym utrudnieniem w skutecznej diagnostyce i zwalczaniu bakterii Cms jest brak odpowiedniego narzędzia diagnostycznego pozwalającego na wysoce specyficzną izolację i identyfikację komórek bakterii Cms z prób środowiskowych. Istnieje kilka ważnych przyczyn, a mianowicie:

- Szczepy bakterii Cms są zróżnicowane pod względem ilości i zawartości wytwarzanych przez nie śluzów. Wysoki stopień mukoidalności nie zawsze ma bezpośrednie przełożenie na zjadliwość poszczególnych szczepów Cms, natomiast niejednokrotnie uniemożliwia efektywną identyfikację komórek Cms metodami immunologicznymi. Oferowane aktualnie przeciwciała poliklonalne skierowane na bakterie Cms wykrywają głównie komponenty śluzów bakteryjnych, dając wynik fałszywie negatywny przy identyfikacji szczepów wytwarzających znikome ilości śluzów. Z kolei przeciwciała monoklonalne, które charakteryzują się zbyt wysoką specyficnością, również nie rozpoznają wielu szczepów bakterii Cms.
- Brak w pełni selektywnych podłoży mikrobiologicznych dla namnażania bakterii Cms oraz obecność w próbie innych, szybko rosnących endogennych i saprofitycznych mikroorganizmów środowiskowych, znacznie ogranicza możliwość uzyskania czystych izolatów Cms i wykonania testu biologicznego pozwalającego na określenie patogeniczności Cms.
- Brak skutecznej metody izolacji bakterii Cms, która pozwoliłaby na zachowanie żywotności badanych izolatów bakteryjnych i pozbycie się wszelkich zanieczyszczeń (mikrobiologicznych, chemicznych, biochemicznych, biologicznych i fizykochemicznych) znajdujących się w pobranych próbach. Tego typu metody odgrywają kluczową rolę w efektywnej diagnostyce mikrobiologicznej. Izolacja przyżyciowa bakterii Cms jest szczególnie utrudniona w przypadku prób zawierających

tkanki roślinne, pozostałości bulw ziemniaka, resztki gleby i wody środowiskowej, charakteryzujących się dużą objętością i niską koncentracją bakterii Cms.

- Ograniczenia molekularnych metod identyfikacji bakterii Cms, które mimo swojej wysokiej czułości i specyficzności mogą być zakłócone przez działanie obecnych w próbach środowiskowych inhibitorów reakcji PCR. Jedną z podstawowych przyczyn wpływających na prawidłową diagnostykę molekularną bakterii Cms jest brak odpowiedniej metody izolacji materiału genetycznego z badanych prób środowiskowych. Zalecana przez EPPO w Dyrektywach Komisji Europejskiej metoda nie pozwala na całkowite usunięcie znajdujących się w badanej próbce zanieczyszczeń oraz inhibitorów reakcji PCR, co może prowadzić do uzyskania w toku analizy molekularnej wyniku fałszywie negatywnego.

### **Cel badań**

Aby rozwiązać powyższe trudności, celem badań przedstawionych w ramach osiągnięcia naukowego było opracowanie innowacyjnych rozwiązań technologicznych pozwalających na izolację i identyfikację wybranych, bakteryjnych patogenów ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) z trudnych diagnostycznie prób środowiskowych, ze szczególnym uwzględnieniem kwarantannowych bakterii Cms.

Prace wchodzące w skład prezentowanego osiągnięcia habilitacyjnego dotyczą opracowania innowacyjnych narzędzi diagnostycznych umożliwiających izolację i identyfikację wybranych, bakteryjnych patogenów ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) z trudnych w diagnostyce prób środowiskowych. **Kluczowym etapem prezentowanego osiągnięcia naukowego było opracowanie wytwarzania nowego rodzaju, wysoce specyficznych poliklonalnych przeciwciał skierowanych na komórki bakterii Cms, charakteryzujących się unikalnymi cechami, jak wysoka czułość i specyficzność oraz zdolność wykrywania bakterii Cms niezależnie od stopnia mukoidalności badanych szczepów (H1, Przewodowski i Przewodowska, 2017).**

Wykorzystanie nowych przeciwciał w konstrukcji immunosorbentów pozwoliło na specyficzne pułapkowanie bakterii Cms oraz umożliwiło opracowanie różnych zestawów i metod diagnostycznych opartych o techniki immunofiltracyjne (H2; Przewodowski, 2013a) i inkubacyjne (H3; Przewodowski, 2013b; H4, Przewodowski, 2013c). Całość osiągnięcia tworzy kompleksowe rozwiązanie diagnostyczne pozwalające ominąć ograniczenia

dotychczasowych metod identyfikacji patogenów bakteryjnych ziemniaka z prób środowiskowych oraz ulepszyć obecne standardy diagnostyczne.

Zarówno z danych literaturowych, jak i badań własnych wynika, iż komercyjne, poliklonalne przeciwciała anti-Cms dobrze wykrywają szczepy wytwarzające śluz, natomiast słabo, bądź w ogóle nie wykrywają szczepów niemukoidalnych. Dowiedli tego Baer i Gudmestad stosując sześć rodzajów przeciwciał anti-Cms. Podczas prowadzonych badań, nie byli w stanie wykryć wielu niemukoidalnych szczepów bakterii Cms metodą ELISA. Autorzy nie zanotowali natomiast problemów z detekcją szczepów bakterii Cms wytwarzających średnie i duże ilości śluzów bakteryjnych (Baer i Gudmestad, 1993). W badaniach własnych oceniając specyficzność komercyjnych przeciwciał z firmy Loewe, dowiedziono, że wysoka zawartość śluzów koreluje z wysoką zawartością cukrów prostych ocenianych chemicznie metodą antronową. Na tej podstawie stwierdzono, że przyczyną nieprawidłowości w diagnostyce bakterii Cms jest oddziaływanie ww. przeciwciał ze składnikami śluzów bakteryjnych otaczających komórki.

W toku badań wykazano również, że obecność śluzu bakteryjnego zawierającego kwaśne egzopolisacharydy uniemożliwia ilościowy pomiar bakterii metodami immunoenzymatycznymi. Udowodniono, że poziom absorbancji mierzony w teście ELISA zależy przede wszystkim od ilości śluzów wytwarzanych przez poszczególne szczepy bakterii Cms, a nie od rzeczywistej ilości komórek w zawieszynie. Przemycanie komórek odpowiednimi buforami pozwala usunąć większość składników śluzu bakteryjnego i ujednolicić wyniki testu ELISA. Efektu tego nie uzyskuje się nawet przy kilkukrotnym przemycaniu zawieszin bakteryjnych wodą. Opracowanie efektywnego sposobu usuwania śluzu z komórek bakteryjnych przez przemycanie ich w buforze o niskim, a następnie wysokim pH umożliwiło znacznie lepszą serologiczną ocenę ilości komórek bakteryjnych niezależnie od stopnia mukoidalności badanych szczepów Cms.

Aby uzyskać odpowiednio specyficzne przeciwciała wykrywające wszystkie szczepy Cms niezależnie od stopnia mukoidalności oraz zapobiec reakcjom niespecyficznym z innymi bakteriami zasiedlającymi badane środowisko, w ramach badań opracowano sposób przygotowania nowego antygeny w postaci mieszaniny komórek bakterii Cms całkowicie pozbawionych zewnętrznych śluzów bakteryjnych. W tym celu użyto liofilizatów trzech skrajnie zróżnicowanych mukoidalnie szczepów Cms w stosunku wagowym 1:1:1. Przed immunizacją komórki bakteryjne przygotowano, stosując metodę opisaną w publikacji H1, w której zastosowanie określonego stężenia, częstotliwości oraz czasu oddziaływania poszczególnych buforów na badane komórki bakteryjne, pozwoliło całkowicie usunąć z nich

powierzchniowe śluzu (H1, Przewodowski i Przewodowska, 2017). Nowoopracowanym antygenem immunizowano króliki, stosując nisko inwazyjny adjuwant Gerbu 100, pozwalający na zwiększenie odpowiedzi immunologicznej zwierzęcia (Ball i in., 1993).

Uzyskane poliklonalne IgG królicze, skierowane na komórki bakteryjne bez śluzu charakteryzowały się wysokim powinowactwem w stosunku do badanych szczepów bakterii *Cms*, przy jednoczesnym słabym oddziaływaniu z innymi bakteriami. Przeciwciała te, nie reagowały z żadnym innym z badanych patogenów ziemniaka poza bakteriami *Cms*. Dla porównania przeciwciała skierowane na bakterie pokryte śluzem znakomicie wykrywały wszystkie szczepy *Cms*, jednakże cechowały się jednocześnie oddziaływaniem niespecyficznym w stosunku do innych badanych patogenów ziemniaka *Pseudomonas fluorescens* oraz *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, co czyni je nieużytecznymi w diagnostyce serologicznej. Według Miller (1984) oraz Kokoskova i Pankova (1998 i 2002) *Pseudomonas fluorescens* jest bakterią bardzo często dającą reakcje krzyżowe w diagnostyce serologicznej bakterii *Cms*. Stwierdzono ponadto, iż żaden z badanych, dostępnych komercyjnie zestawów (Loewe, Agdia, Adgen) nie wykrywa wszystkich szczepów bakterii *Cms*. Komercyjny zestaw z firmy Loewe, bazujący na wykorzystaniu przeciwciał poliklonalnych, nie wykrywał aż 5 spośród 29 badanych szczepów *Cms* i wykrył tylko jeden szczep z grupy niemukoidalnych (szczep 527). Lepsze cechy wykazały w tym względzie zestawy z przeciwciałami monoklonalnymi z firmy Agdia oraz przeciwciałami poliklonalnymi do PTA-ELISA z firmy Adgen, które nie wykryły tylko dwóch z dwudziestu dziewięciu badanych szczepów *Cms*.

Podsumowując, spośród badanych komercyjnie dostępnych zestawów opartych zarówno o mono- jak i poliklonalne przeciwciała anty-*Cms*, żaden nie wykrywał w 100% wszystkich badanych szczepów *Cms*. Najlepsze rezultaty uzyskano, stosując nowoopracowane w ramach wynalazku H1 IgG poliklonalne skierowane na bakterie *Cms* pozbawione śluzów. Wykrywały one wszystkie badane szczepy *Cms* niezależnie od stopnia ich mukoidalności. Opracowanie tego typu przeciwciał charakteryzujących się jednocześnie szerokim spektrum działania i niereagujących niespecyficznie z innymi patogenami ziemniaka pozwoliło na konstruowanie nowych testów immunodiagnostycznych do identyfikacji tej bakterii. Szybkie, czułe, specyficzne testy immunodiagnostyczne cieszą się ciągle zainteresowaniem i będą rozwijały się w przyszłości (Danks i Barker, 2000). Wytworzenie nowych przeciwciał poliklonalnych do wykrywania bakterii *Cms*, charakteryzujących się relatywnie wysoką specyficznością wskazuje nowy kierunek, który pozwala na opracowanie serologicznego sposobu wykrywania bakterii skrajnie zróżnicowanych mukoidalnie.

Kolejnym etapem badań było opracowanie metod służących izolacji i identyfikacji bakterii Cms z prób środowiskowych.

Pomimo wielu lat badań nie opracowano odpowiednich rozwiązań diagnostycznych pozwalających na skuteczną, przyżyciową izolację oraz wysoce specyficzną identyfikację uzyskanych komórek bakterii Cms z tego typu prób. Również zalecane obecnie przez EPPO metody diagnostyczne nie dają takich możliwości. Bazują one głównie na zagęszczaniu bakterii poprzez wirowanie komórek w polu siły odśrodkowej lub filtrację na filtrach antibakteryjnych zawiesiny bakteryjnej (OEPP/EPPO 2006). Skutkiem tego jest koncentracja komórek Cms wraz z innymi zanieczyszczeniami znajdującymi się w badanej próbce.

**Wynalazki przedstawione w ramach prezentowanego osiągnięcia naukowego (H2, Przewodowski, 2013; H3, Przewodowski, 2013; H4, Przewodowski, 2013) obejmują skuteczne rozwiązania dotychczasowych problemów z diagnostyką bakterii Cms z prób środowiskowych.**

Wiele ze wspomnianych powyżej problemów z izolacją i identyfikacją *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* rozwiązano przy pomocy opracowań metodycznych w ramach pierwszego z wynalazków stanowiących część dzieła (H2, Przewodowski 2013).

Wynalazek ten zawiera sposób wykrywania obecności bakterii Cms z wykorzystaniem membran poliwęglanowych opłaszczonych miejscowo przeciwciałami. Jego zasada działania polega na tym, że analizowaną, potencjalnie zawierającą bakterie Cms próbę (np. ekstrakt z tkanki bulw lub roślin ziemniaka) zawieszają w roztworze buforowym. Tak uzyskaną mieszaninę filtruje się przez membranę, na powierzchni której miejscowo osadzono, za pomocą polimeru, przeciwciała anty-Cms opracowane na potrzeby tego badania. Sposób konstrukcji testu i zastosowanie wysoce specyficznych przeciwciał pozwala na szybkie i wysoce selektywne wiązanie jedynie komórek Cms, z jednoczesną możliwością usunięcia pozostałych zanieczyszczeń obecnych w badanej próbce. Te ostatnie, stanowiące komponenty ekstraktu i komórki innych mikroorganizmów środowiskowych, jako nie rozpoznane przez przeciwciała, zostają usunięte przepływając przez pory w membranie. Na etapie oceny działania wynalazku, wykazano wysoką skuteczność immobilizowanych na powierzchni polimeru przeciwciał anty-Cms.

Jednym z najważniejszych rozwiązań w ramach wynalazku było opracowanie odpowiednich warunków buforowych, które z jednej strony pozwoliły na zachowanie odpowiedniej siły jonowej, niezbędnej do skutecznego działania IgG (rozpoznania i wiązania

epitopów na powierzchni bakterii), a z drugiej strony nie powodowały utraty żywotności badanych komórek.

Równie istotne było uzyskanie odpowiednich właściwości półprzepuszczalnej matrycy poliwęglanowej pozwalające uzyskać wysoką skuteczność immunokoncentracji i usunięcie zanieczyszczeń. Poliwęglan, z którego wykonana jest membrana charakteryzuje się niską reaktywnością chemiczną i stosunkowo dużą odpornością fizyczną, natomiast średnica porów membrany jest kilkakrotnie większa od bakterii i komponentów ekstraktu. Właściwości te umożliwiają szybką i skuteczną filtrację wynikającą z dobrej przepustowości membrany oraz niskiej niespecyficznego sorpcji zanieczyszczeń do jej powierzchni.

Ujemną stroną stosowanego poliwęglanu, podobnie jak innych materiałów o niskiej reaktywności chemicznej, jest brak możliwości bezpośredniego umieszczenia przeciwciał na jego powierzchni. Dlatego, w ramach osiągnięcia naukowego, konieczne było znalezienie sposobu, który pozwoliłby na trwałą, kowalencyjną immobilizację badanych IgG na powierzchni membrany.

Przydatne okazało się doświadczenie zdobyte na stażu w firmie biotechnologicznej Sartorius, na którym zajmowałem się modyfikacją chemiczną powierzchni membran. Prace wykonywałem wówczas na membranach z regenerowanej celulozy, bogatych w reaktywne chemicznie grupy aminowe i aldehydowe, które pozwalały na stosunkowo łatwe wiązanie do powierzchni membrany makrocząsteczek biologicznych, typu enzymy i przeciwciała. Z drugiej jednak strony rozbudowana przestrzennie, kilkunastowarstwowa struktura membrany oraz wysoka zawartość grup chemicznych powodowała wiązanie wielu zanieczyszczeń, co spowodowało, że użycie tej membrany w diagnostyce Cms okazało się zbyt ryzykowne. Dlatego w ramach osiągnięcia zastosowano niereaktywną chemicznie membranę poliwęglanową oraz opracowano nowy sposób modyfikacji powierzchni przy użyciu polimeru aniliny bogatego w grupy aminowe oraz łączenia kowalencyjnego uzyskanego polimeru aldehydem glutarowym lub nanocząsteczkami koloidu złota. Zastosowany układ poliwęglan – polianilina - IgG, pozwolił na izolację wszystkich badanych szczepów Cms, niezależnie od stopnia mukoidalności. Z drugiej strony wysoka specyficzność zastosowanych IgG charakteryzująca się brakiem oddziaływań krzyżowych z komponentami ekstraktu i śluzów innych bakterii, pozwala na łatwe pozbycie się zanieczyszczeń z badanej próby.

Sam sposób polimeryzacji aniliny w momencie opracowania rozwiązania był znany (Y Wei i in., 1989; Stejskal i in., 1999), jednak nie stosowano go natomiast do modyfikacji membran poliwęglanowych, które były wówczas nowością. Opracowany w ramach wynalazku sposób polimeryzacji pozwolił na miejscową aktywację matrycy poliwęglanowej

polimerem. To z kolei, po stosowaniu aldehydu glutarowego lub nanocząsteczek złota jako łącznika IgG, umożliwiło chemicznie trwale mocowanie przeciwciał dokładnie w miejscu tych modyfikacji. Niewątpliwą zaletą takiego rozwiązania jest szybka i selektywna koncentracja komórek bakterii Cms z dużej objętości badanej próby na małej powierzchni i przez to zwiększenie czułości detekcji.

Opracowany sposób pozwala dalej analizować na kilka sposobów immunopułapkowane na powierzchni membrany komórki Cms:

1. Pierwszy sposób to bezpośrednia wizualna analiza badanych bakterii Cms pod mikroskopem klasycznym lub epifluorescencyjnym, po uprzednim wybarwieniu powierzchni tych komórek odpowiednio koniugatem przeciwciał anti-Cms ze złotem koloidalnym lub barwnikiem fluorescencyjnym.
2. Drugi, nieco bardziej czasochłonny sposób, który pozwala uzyskać wyższą czułość detekcji, to identyfikacja przyżyciowa, poprzedzona etapem biowzbogacania, polegająca na umieszczeniu i inkubacji membrany stroną aktywną bezpośrednio na podłożu mikrobiologicznym i w ten sposób namnożeniu bakterii Cms do dalszych badań. Uzyskany, skoncentrowany i czysty izolat żywotnych komórek można łatwo analizować dowolną techniką EPPO (testem IF, PCR lub przyżyciowym na roślinie bioindykatorowej) bez ryzyka uzyskania wyniku fałszywie negatywnego.

Opracowana w ramach wynalazku metoda jest szybka, prosta i funkcjonalna. Umożliwia zarówno przyżyciową, jak i wizualną - mikroskopową ocenę morfologii identyfikowanych komórek bakteryjnych. Uniwersalność opracowanego testu pozwala również na diagnostykę chorób powodowanych przez inne patogeny po zastosowaniu przeciwciał ukierunkowanych na danego patogena.

Kolejnym, opracowanym w ramach prezentowanego osiągnięcia rozwiązaniem jest zestaw inkubacyjny do wykrywania i przyżyciowego izolowania wybranych bakterii (**H3**, Przewodowski 2013).

Zasada działania zestawu polega na tym, że próbę zawierającą badane bakterie Cms (np. ekstrakt z tkanki z roślin i bulw ziemniaka, gleby, wody), zawieszają w roztworze buforowym i inkubują w naczyniu z aktywowanym miejscowo immunopodłożem. W trakcie inkubacji dochodzi do kontaktu bakterii z przeciwciałami znajdującymi się na powierzchni polimeru. Wskutek wysokiej specyficzności przeciwciał anti-Cms, rozpoznane i wyłapano z roztworu zostają jedynie komórki Cms, natomiast inne drobnoustroje, jak również pozostałe

komponenty i zanieczyszczenia w próbce zostają skutecznie usunięte podczas etapu płukania. Aby zapobiec przypadkowemu osadzeniu się zanieczyszczeń oraz innych mikroorganizmów mogących zafałszować wynik analizy, naczynia do inkubacji wykonano z mało reaktywnych chemicznie materiałów, jak polistyren, polietylen, poliwęglan czy szkło. Z kolei umieszczenie przeciwciał w ściśle określonym miejscu i na bardzo małej powierzchni naczynia pozwala wyłapać bakterie Cms z dużej objętości i silnie je skoncentrować. Przy bardzo dużych objętościach istotne jest, aby znajdujące się na powierzchni polimeru przeciwciała charakteryzowały się jak najwyższą efektywnością i były skierowane nie w sposób przypadkowy, ale stroną aktywną w kierunku antygeny. Ukierunkowany sposób immobilizacji uzyskano poprzez oksydację grup karboksylowych przeciwciał oraz kowalencyjne wiązanie z grupami aminowymi polimeru poprzez redukcję/stabilizację wiązań przy pomocy  $\text{NaCNBH}_4$ . Rozwiązanie to pozwoliło znacznie zwiększyć czułość reakcji a przez to skrócić czas wykonania analizy.

Podobnie jak w przypadku wynalazku **H2**, zestaw inkubacyjny pozwala na potwierdzenie obecności immunopułpkowanych komórek Cms na kilka sposobów:

1. Pierwszy sposób umożliwia obserwację i analizę morfologii immunopułpkowanych komórek Cms na podłożu lub jego fragmencie umieszczonym pod mikroskopem klasycznym po uprzednim wybarwieniu komórek koniugatem przeciwciał anty-Cms ze złotem koloidalnym lub znacznikiem enzymatycznym (np. fosfatazą alkaliczną). Po przeprowadzeniu reakcji enzymatycznej z substratem (BCIP/NBT) uzyskuje się nierozpuszczalny produkt na powierzchni wyłapanych komórek bakterii.
2. Istnieje również możliwość obserwacji immunopułpkowanych bakterii pod mikroskopem epifluorescencyjnym po uprzednim wyznakowaniu tych komórek koniugatem przeciwciał anty-Cms z odpowiednim fluorochromem (np. indokarbocyaniną, fluoresceiną lub kropkami kwantowymi). W tym przypadku wykorzystuje się nie tylko właściwości fizykochemiczne polianiliny jako podłoża dla IgG, ale również jej właściwości optyczne. Polimer ten posiada bowiem zdolność wytłumiania światła UV wzbudzającego świecenie fluorochromu, którym wyznakowane są bakterie. Uzyskany obraz staje się przez to bardziej kontrastowy. Standardowo do tego celu stosuje się albo ciemne (czarne) podłoże oraz odpowiedni filtr.
3. Opracowany zestaw daje również możliwość identyfikacji przyżyciowej immobilizowanych komórek Cms. Zoptymalizowane warunki buforowe oraz odpowiedni sposób usuwania (desorpcji) Cms z powierzchni immunosorbentu, pozwalają na zachowanie żywotności badanych komórek. Do desorpcji komórek zastosowano silnie

alkaliczny bufor (np. 0,1M roztworu glicyna-NaOH pH 10,5), który zmniejsza siłę wiązania przeciwciała-antygen i uwalnia bakterie z powierzchni immunosorbentu. To z kolei umożliwia wykonanie posiewu na podłożu wzrostowym i namnożenie badanych komórek. Uzyskanie żywotnych komórek i ich namnożenie ma ogromne znaczenie w badaniu danego szczepu bakteryjnego w teście patogeniczności z udziałem roślin indykatorowych, ponieważ pozwala stwierdzić, czy i jaki jest stopień zjadliwości (wirulencji) wyizolowanego szczepu bakteryjnego. Po namnożeniu uzyskany w ten sposób czysty izolat Cms może być również analizowany dowolną techniką zalecaną przez EPPO (testem IF, PCR) lub inną.

W porównaniu z zestawem do immunofiltracji opracowany zestaw nie wymaga stosowania dodatkowych urządzeń i jest mniej wrażliwy na obecność komponentów i zanieczyszczeń obecnych w badanych próbach środowiskowych. Ponadto, przez dowolność w doborze pojemności naczynia, opracowany zestaw poza tkankami roślinnymi umożliwia badanie również prób takich, jak woda środowiskowa i gleba, charakteryzujących się znacznie większą objętością oraz wysokim stopniem zanieczyszczenia. Przeprowadzone w ramach wynalazku badania z udziałem innych patogenów ziemniaka, jak bakterie *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* oraz *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, wykazały wysoką przydatność opracowanego zestawu w izolacji i identyfikacji tych bakterii z ekstraktów bulw ziemniaka.

Ostatni wynalazek stanowiący część osiągnięcia, to zestaw do wykrywania i przyżyciowego izolowania bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w analizowanej próbce, szczególnie przydatny w identyfikacji bakterii Cms w próbach silnie zanieczyszczonych o dużej objętości. (H4, Przewodowski 2013)

Zasada działania zestawu polega na umieszczeniu w analizowanej próbce (ekstrakcie z gleby lub wodzie środowiskowej), drobnoziarnistego immunosorbentu w postaci mikrosfer opłaszczonych przeciwciałami anti-Cms, wyłapywaniu bakterii Cms podczas inkubacji i powolnej dekantacji mikrosfer na dnie naczynia, w którym znajduje się badany roztwór. Wskutek wysokiej specyficzności przeciwciał anti-Cms, rozpoznane i wyłapane zostają jedynie bakterie Cms, natomiast inne drobnoustroje, jak również pozostałe komponenty i zanieczyszczenia próby zostają skutecznie usunięte podczas etapu płukania.

Wynalazek ten, w odróżnieniu od dwóch poprzednich, umożliwia izolację bakterii Cms równocześnie z całej objętości badanej próby. Podejmowane dotychczas przez firmy komercyjne próby opracowania i wdrożenia zestawów do izolacji Cms z całej objętości próby

przy wykorzystaniu złoża magnetycznego okazały się mało skuteczne - z uwagi na brak odpowiednio specyficznych przeciwciał oraz niską trwałość matrycy magnetycznej. Natomiast stosowanie proponowanych przez EPPO, opisanych wcześniej sposobów izolacji Cms powoduje pozostawianie dużej ilości zanieczyszczeń izolowanych wraz z bakteriami Cms. Kluczowym rozwiązaniem okazało się zastosowanie, opracowanego w ramach wynalazku H3, ziarnistego immunosorbentu charakteryzującego się odpowiednią trwałością i rozbudowaną powierzchnią sorpcyjną, co umożliwiło szybkie i specyficzne wydzielenie komórek Cms z dużej objętości silnie zanieczyszczonych prób.

Jako podłoże do izolacji użyto komercyjnie dostępne mikrosfery dekstranu, powszechnie stosowane w chromatografii kolumnowej jako Sephadex (Bilkova et al., 1997; Kaseda et al., 2001; Karmarkar et al., 2006). Pomimo wielu korzystnych właściwości fizykochemicznych dekstranu, sam materiał jako hydrożel ma mały ciężar właściwy i bardzo długo utrzymuje się w roztworze. To z kolei uniemożliwia bezpośrednie wykorzystanie mikrosfer dekstranu jako immunopodłoża do izolacji komórek bakterii z silnie zanieczyszczonych prób o dużej objętości i gęstości. Konieczne było zatem, znalezienie sposobu pozwalającego z jednej strony na zwiększenie ciężaru właściwego mikrosfer, a z drugiej na uzyskanie powierzchni zdolnej do trwałego, kowalencyjnego osadzania przeciwciał na ich powierzchni. Pomimo powszechności stosowania mikrosfer dekstranowych, żaden z dotychczasowych sposobów modyfikacji nie pozwalał na osiągnięcie obu parametrów jednocześnie.

Efekt ten uzyskano stosując opracowany wg. niniejszego wynalazku sposób chemicznej modyfikacji dekstranu (poprzez aminosilanizację, aktywację aldehydem glutarowym i chitozanem lub aminocysteina) oraz kowalencyjnego osadzania koloidu złota i przeciwciał anty-Cms na jego powierzchni.

Szczególnie istotne okazało się opracowanie i wykorzystanie nanocząsteczek koloidu złota, których obecność na powierzchni mikrosfer pozwoliła znacznie zwiększyć powierzchnię sorpcyjną podłoża, dała możliwość ukierunkowanego unieruchomienia przeciwciał oraz nadała odpowiedni ciężar ziarnom dekstranu. To rozwiązanie pozwala na chwilowe, kilkuminutowe utrzymanie mikrosfer w badanym roztworze i następnie ich dekantację na dnie naczynia, co znacznie upraszcza i usprawnia uzyskanie czystych izolatów Cms, bez konieczności stosowania dodatkowych urządzeń i procedur zalecanych przez EPPO.

Opracowana w ramach wynalazku metodyka pozwala na diagnostykę immunokoncentrowanych na powierzchni mikrosfer komórek Cms kilkoma sposobami. Pierwszy sposób to analiza immunoenzymatyczna po uprzednim zastosowaniu koniugatu

przeciwciał anty-Cms z enzymem (np. peroksydazą, alkaliczną fosfatazą, lub innym), który po zastosowaniu odpowiedniego substratu, w przypadku obecności komórek Cms na powierzchni mikrosfer pozwala uzyskać barwny produkt reakcji immunoenzymatycznej. Natomiast wykorzystanie właściwości dekstranu oraz opracowanie odpowiednich warunków podczas izolacji pozwala zachować żywotność i wykonać identyfikację przyżyciową izolowanych komórek Cms. Etap biowzbogacania, pozwalający na namnożenie komórek Cms do dalszych badań, następuje poprzez umieszczenie i inkubację mikrosfer bezpośrednio na mikrobiologicznym podłożu wzrostowym. Namnożone i żywotne komórki Cms można analizować po zastosowaniu koniugatu przeciwciał anty-Cms ze złotem koloidalnym, enzymem lub fluorochromem, jak również dowolną techniką EPPO (testem IF, PCR lub przyżyciowym na roślinie bioindykatorowej), bez ryzyka uzyskania wyniku fałszywie negatywnego.

Czułość testu immunoenzymatycznego i przyżyciowego z wykorzystaniem ziaren dekstranu opłaszczonych nanocząsteczkami koloidu złota wynosiła odpowiednio 500 i 50 jtk/ml w przypadku wykrywania Cms. Z kolei zmiana na powierzchni dekstranu przeciwciał anty-Cms na przeciwciała skierowane na gram-ujemne bakterie *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, pozwoliło na detekcję komórek sprawcy mokrej zgnilizny ziemniaka metodą immunoenzymatyczną. Udowodniono tym samym uniwersalność i przydatność wynalazku w izolacji i identyfikacji innych patogenów bakteryjnych w ekstrakcie z bulw ziemniaka.

## Podsumowanie

Podsumowując warto zaznaczyć, że opracowane w ramach opisanego osiągnięcia rozwiązania pozwalają zredukować aktualnie występujące problemy z izolacją i identyfikacją sprawcy bakteriozy pierścieniowej z prób środowiskowych.

Jednym z najważniejszych dokonań osiągnięcia było opracowanie wysoce specyficznych poliklonalnych przeciwciał anti-Cms łączących w sobie cechy zarówno wysokiej specyficzności przeciwciał monoklonalnych, jak i wysokiej czułości przeciwciał poliklonalnych (**H1**, Przewodowski i Przewodowska, 2017). Połączenie tych właściwości pozwoliło na detekcję komórek bakterii Cms niezależnie od stopnia ich mukoidalności oraz uniknięcie niespecyficznych oddziaływań z innymi bakteriami i komponentami zanieczyszczeń znajdujących się w badanych próbach środowiskowych.

Kolejnym ważnym etapem było opracowanie materiałów, warunków izolacji i metod identyfikacji komórek bakteryjnych opisanych w trzech prezentowanych wynalazkach (**H2**, Przewodowski, 2013; **H3**, Przewodowski, 2013; **H4**, Przewodowski, 2013). Zastosowanie przeciwciał w opracowaniu immunosorbentów na powierzchni struktur porowatych (membran), naczyń (szalek) lub mikrosfer umożliwiło szybką i wysoce specyficzną koncentrację komórek bakterii Cms na małej powierzchni z dużej objętości badanej próby, z jednoczesną eliminacją innych komórek bakteryjnych porastających podłoża mikrobiologiczne dla Cms oraz substancji, których obecność w testach typu PCR oraz IF niesie wysokie ryzyko zafałszowania wyniku.

Opracowane rozwiązania pozwalają na identyfikację immunopułpkowanych komórek Cms na wiele sposobów. Jednym z nich jest bezpośrednia, wizualna analiza morfologii immunopułpkowanych komórek bakterii pod mikroskopem klasycznym lub epifluorescencyjnym, po uprzednim wybarwieniu powierzchni tych komórek odpowiednio koniugatem przeciwciał anti-Cms ze złotem koloidalnym, enzymem lub barwnikiem fluorescencyjnym. Sposobem nieco dłuższym, ale pozwalającym uzyskać wyższą czułość detekcji jest identyfikacja przyżyciowa poprzedzona etapem biowzbogacania. Pozwala ona na uzyskanie czystego skoncentrowanego izolatu wysoce żywotnych komórek Cms do dalszych badań. Uzyskany w ten sposób materiał można analizować stosując koniugat przeciwciał anti-Cms ze złotem koloidalnym, enzymem lub fluorochromem lub dowolną techniką EPPO (testem IF, PCR lub przyżyciowym na roślinie bioindykatorowej) bez ryzyka uzyskania wyniku fałszywie negatywnego.

## Literatura

- Annual Report 2016/2017. EC DG Health and Food Safety Potato Ring Rot and Brown Rot Surveys in the EU. [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/ph\\_biosec\\_leg\\_annual\\_report\\_2016-7\\_potato-rot.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/ph_biosec_leg_annual_report_2016-7_potato-rot.pdf).
- Baer D., Gudmestad N.C., 1993. Serological detection of nonmucoid strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato. *Phytopathology* 83: 157-163.
- Ball E., Hampton R., De Boer S., Schaad N., 1993. Polyclonal antibodies. Section II.B.1. [in:] *Serological Methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens A laboratory manual*. Hampton R., Ball E., De Boer S. (eds); APS Press, 42-44.
- Bilkova Z., Churacek J., Kucerova Z., Turkova J., 1997. Purification of anti-chymotrypsin antibodies for the preparation of a bioaffinity matrix with oriented chymotrypsin as immobilized ligand. *Journal of Chromatography B* 689: 273–279.
- Chotkowski J., Rembeza J. 2013. „Bakterioza pierścieniowa ziemniaka jako choroba kwarantanna – uzasadniona ostrożność, czy forma protekcji handlowej?”. *Stowarzyszenie ekonomistów rolnictwa i agrobiznesu. Roczniki Naukowe Tom XV, zeszyt 1: 12 – 17.*
- Danks C. Barker I. 2000. On-site detection of plant pathogens using lateral-flow devices. *OEPP/EPPO Bulletin*. 30: 421 - 426.
- De Boer S.H., Charkowski A.O., Zink R.T., Martínez-Soriano J.P., and Flores-Olivas A., 2005. Procedure for detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieckermann and Kotthoff) Davis, Gillaspie, Vidaver and Harris, in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23: 329-334.
- Dyrektywa Komisji Wspólnot Europejskich Nr 2006/56 z dnia 12 czerwca 2006 zmieniająca załączniki do dyrektywy Rady EEC 93/85 w sprawie zwalczania bakteriozy pierścieniowej ziemniaka. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej* L 182/27 4.7.2006 PL.
- Easton G. D. 1979. The biology and epidemiology of potato ring rot. *Am. Potato J.* 56: 459 — 460.
- EPPO A2 List, <https://www.eppo.int/QUARANTINE/listA2.htm>
- FAOSTAT 2017, <http://faostat3.fao.org>
- Karmarkar S., Garber R., Kluza J., Koberda M., 2006. Gel permeation chromatography of dextrans in parenteral solutions: Calibration procedure development and method validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41: 1260–1267.
- Kaseda K., Kodama T., Fukui K., Hirose K., 2001. A novel approach for purification of recombinant proteins using the dextran-binding domain. *FEBS Letters* 500: 141-144.
- Kokoskova B, Pankova I. 1998. Sensitivity and specificity of polyclonal antisera for determination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and their use by the slide agglutination. *Plant Protect. Sci.* 32: 121 - 125.
- Kokoskova B, Pankova I, Krejzar V. 2000. Characteristics of polyclonal antisera for detection and determination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*. *Plant Protect. Sci.* 36: 81 - 84.

- Lebecka R., Zimnoch – Guzowska E. 2005. Choroby bakteryjne ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) — strategie ochrony. Biuletyn IHAR 237/238: 161 – 168.
- Lee I.-M., Bartoszyk I.M., Gundersen D.E., Mogen B., Davis R. E., 1997. Nested PCR for Ultrasensitive Detection of the Potato Ring Rot. Bacterium, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Applied And Environmental Microbiology July: 2625–2630.
- Li X., Tambong J., Kat (Xiaoli) Yuan,<sup>1</sup> Wen Chen,<sup>2</sup> Huimin Xu,<sup>1</sup> C. Andre Levesque<sup>2</sup> and Solke H. De Boer. 2018. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 68: 234-240.
- Miller HJ. 1984. Cross-reactions of *Corynebacterium sepedonicum* antisera with soil bacteria associated with potato tubers. Neth. J. Plant Pathol. 90: 23 - 28.
- Muller H. J., Ficke W. 1974. Bacterial ring rot (*Corynebacterium sepedonicum*) a dangerous quarantine disease for potato cultivation. Nachrichtenblatt für den Pflanzenschutz in der DDR 28: 159 — 160.
- OEPP/EPPO, 2006. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. OEPP/EPPO Bulletin 36: 99–109.
- Pastuszewska T., Gryń G., Franke K. 2010. Podatność wybranych odmian ziemniaka na porażenie przez *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin 50 (1): 245 - 248.
- Przewodowski W., Treder K. 2008. Trudności związane z diagnozą i eliminacją bakteriozy pierścieniowej ziemniaka. Ziemn. Pol. 2008(4): 1-3.
- Stejskal J., Sapurina I., Prokes J., Zemek J. 1999. In-situ polymerized polyaniline films. Synthetic Metals 105: 195–202.
- Van der Wolf, J. M., Elphinstone, J. G., Stead, D. E., Metzler, M., Müller, P., Hukkanen, A., & Karjalainen, R. 2005. Epidemiology of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in relation to control of bacterial ring rot (No. 95). PRI Bioscience.
- Wei Y., Tang X., Sun Y. 1989. A Study of the Mechanism of Aniline Polymerization. Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry, Vol. 27, 2385-2396.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Pracę naukowo-badawczą rozpocząłem w 2001 roku pod kierunkiem dr hab. Jerzego Lewosza na Wydziale Mechanicznym Politechniki Koszalińskiej. Głównym zagadnieniem badawczym, którym się wówczas zajmowałem było różnicowanie i identyfikacja odmian ziemniaka przy pomocy technik biochemicznych i molekularnych. Realizowane prace związane były z wykorzystaniem markerów biochemicznych oraz molekularnych odpowiednio białkowych inhibitorów trypsyny izolowanych metodą chromatografii powinowactwa i analizowanych na podstawie elektroforezy poliakrylamidowej oraz sekwencji DNA z bulw ziemniaka uzyskiwanych techniką ISSR-PCR (ang. Inter Simple Sequence Repeat PCR) przy pomocy primerów intersatelitarnych typu AC i AG, analizowanych techniką elektroforezy agarozowej. Badania pozwoliły na opracowanie szybkiej i specyficznej metodyki różnicowania i badania tożsamości badanych odmian ziemniaka i były podstawą mojej pracy magisterskiej pt.: "Identyfikacja jednorodności i tożsamości odmianowej ziemniaka przy pomocy markerów biochemicznych i genetycznych", którą obroniłem w 2001 roku z wynikiem bardzo dobrym.

Uzyskane wyniki mające potencjalnie duże znaczenie praktyczne, szczególnie w identyfikacji odmianowej ziemniaka, zostały zaprezentowane podczas konferencji naukowo-szkoleniowej (Przewodowski i in. 2006) oraz w formie publikacji (Przewodowski i in. 2007):

### PUBLIKACJE:

1. Przewodowski W., Lewosz J., Treder K., Pilecki T., Barnyk A. 2007. Identyfikacja odmian ziemniaka metodą elektroforetyczną. Biul. IHAR 243: 151-157.

### KONFERENCJE:

1. Przewodowski W., Lewosz J., Treder K., Pilecki T., Barnyk A. 2006. Identyfikacja odmian ziemniaka metodami biochemicznymi. [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk-szkol. Kołobrzeg, 30-31 marca 2006. IHAR ZNiOZ Bonin: 96.

Po obronie pracy magisterskiej, podjąłem studia doktoranckie na Wydziale Mechanicznym Politechniki Koszalińskiej. W początkowym okresie tj. od września 2001 r. do listopada 2002 r. prowadziłem badania w Katedrze Mikrobiologii. Dotyczyły one głównie stosowania klasycznych technik mikrobiologicznych w izolacji i identyfikacji mikroorganizmów znajdujących się w żywności, jak również patogenów chorobotwórczych roślin, zwierząt i ludzi. Po przejściu do Katedry Biochemii i Biotechnologii, moje badania wzbogacone zostały dodatkowo o szereg różnych metod chemii i biochemii, jak również technik bioanalizy i instrumentalnej analizy żywności. Realizowane prace skupiały się na opracowywaniu sposobów wytwarzania oraz modyfikacji powierzchni nowego typu matryc biosensorowych służących do budowy biosensorów wykorzystywanych w detekcji i analizie

mikroorganizmów. Wynikiem mojej pracy z tego okresu było m. innymi dokonanie dwóch zgłoszeń patentowych na wynalazki dotyczące sposobu wytwarzania i modyfikacji bio-membran (Przewodowski i Lewosz 2010a, 2010b). Badania te dotyczyły opracowania nowych, aktywnych biologicznie, półprzepuszczalnych membran polifenolowych powstających na bazie błon wiskozowych wskutek enzymatycznej kopolimeryzacji substancji fenolowych z jednoczesną inkrustracją aktywnych biologicznie cząsteczek biologicznych. Opracowane sposoby modyfikacji błony umożliwiły kowalencyjne wiązanie do jej powierzchni różnych, biologicznie aktywnych cząstek biologicznych (typu enzymy, przeciwciała), pozwalając tym samym na uzyskanie membrany aktywnej biologicznie. Uzyskano w ten sposób szerokie potencjalne spektrum aplikacyjne opracowanych rozwiązań w analizie laboratoryjnej, budowie biosensorów, procesach z dziedzin biotechnologii, technologii żywności i inżynierii środowiska. Możliwości wykorzystania wynalazków zaprezentowano na dwóch ogólnopolskich kongresach, tj. Biotechnologicznym w Łodzi (2003 r.), Biochemii i Biologii Komórki w Olsztynie (2008 r.) (Lewosz i Przewodowski 2003, Przewodowski i Lewosz 2008), oraz XXXVII Sesji Naukowej Komitetu Nauk o żywności PAN, podczas której praca została wyróżniona przez komisję złożoną z członków PAN za innowacyjność, oryginalność oraz funkcjonalność (Przewodowski i Lewosz 2006).

#### PATENTY:

1. Przewodowski W., Lewosz J. 2009. Sposób wytwarzania bio-membran. Patent UP RP nr P 204512.
2. Przewodowski W., Lewosz J. 2010. Sposób modyfikacji bio-membran. Patent UP RP nr P 206271.

#### KONFERENCJE:

1. Lewosz J., Przewodowski W. 2003. Wytwarzanie membran polifenolowych na drodze enzymatycznej polimeryzacji pochodnych fenoli. [W:] II Krajowy Kongres Biotechnologiczny, Komunikat PD10 Łódź 23-27 czerwca 2003. Streszczenie: 98.
2. Przewodowski W., Lewosz J. 2006. Sposoby wytwarzania membran polifenolowych jako podłoża do immobilizacji enzymów i potencjalne możliwości ich wykorzystania w produkcji i analizie żywności. [W:] XXXVII Sesja Naukowa Komitetu Nauk o żywności PAN pt. Doskonalenie jakości żywności i żywienia w perspektywie potrzeb konsumenta XXI wieku. Gdynia, 26-27 września 2006. Streszczenie: 306.
3. Przewodowski W., Lewosz J. 2008. The way of fabrication of polyphenolic membranes as functional matrix for enzymes immobilization and their potential applications in production and food analysis. (Poster) [In:] Session L. Biochemistry of Food and Nutrition of The Congress of Biochemistry and Cell Biology, Olsztyn, Poland, September 7-11 2008, Abstracts, Acta Biochimica Polonica, 55(3): 280.

Jako beneficjent 11-miesięcznego stażu naukowego w ramach Programu Leonardo da Vinci, uczestniczyłem w badaniach realizowanych w firmie biotechnologicznej Sartorius (Getynga, Niemcy), specjalizującej się w opracowywaniu i produkcji membran filtracyjnych. Uczestniczyłem wówczas w badaniach wykonywanych w ramach międzynarodowego projektu AIMs (Methods for Material Performance and Evaluation) w 6 Programie Ramowym UE, które polegały na opracowaniu nowych i udoskonalaniu istniejących typów membran filtracyjnych stosowanych w oczyszczaniu bio-molekuł (przeciwciał i innych białek),

modyfikacji powierzchni tych membran, analizie instrumentalnej oraz wdrażaniu opracowanych membran jako gotowych produktów na skalę przemysłową. Wykonywane prace pozwoliły mi na poznanie nowoczesnych technik modyfikacji powierzchni membran oraz zdobycie doświadczenia w zakresie modyfikacji chemicznej oraz biochemicznej matryc filtracyjnych z regenerowanej celulozy i jej pochodnych. Wyniki opracowanych przeze mnie podczas stażu rozwiązań zostały wyróżnione przez kierownictwo działu za przydatność i oryginalność oraz wdrożone do produkcji nowych membran służących oczyszczaniu cząsteczek biologicznych o potencjalnym wykorzystaniu w medycynie, diagnostyce i przemyśle farmaceutycznym.

Rozpoczynając studia doktoranckie, równoległe jako wolontariusz rozpocząłem ponad czteroletnią praktykę w Zakładzie Nasiennictwa i Ochrony Ziemiaka IHAR w Boninie. Uczestnicząc w pracach realizowanych wówczas w Pracowni Serologii oraz Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Biochemii, wykonywałem badania, które dotyczyły opracowywania przeciwciał poliklonalnych na wirusy ziemniaka oraz zestawów immunologicznych do ich wykrywania. Pozwoliło mi to na zapoznanie się z różnymi technikami immunizacji zwierząt, oczyszczania przeciwciał z surowicy krwi oraz metodami analizy jakości (miana i specyficzności) uzyskanych przeciwciał. Jednym z zadań było opracowanie koniugatów uzyskanych przeciwciał z enzymami (np. alkaliczną fosfatazą, peroksydazą chrzanową, itp.) pozwalające na uzyskanie znaczników immunoenzymatycznych służących wykrywaniu wirusów ziemniaka metodą ELISA. Po zatrudnieniu w styczniu 2006 roku, nadal uczestniczyłem w pracach związanych z diagnostyką wirusów, wykonując m. innymi zadania w ramach projektów badawczych, w tym z Postępu Biologicznego w Produkcji Roślinnej (PBwPR) MRiRW (2008-13) oraz NCN (2011-14). Wyniki prac zespołu zaprezentowane zostały podczas dwóch konferencji (Pilecki i in., 2006; Pilecki i in. 2007) oraz w formie czterech publikacji (Treder i Przewodowski, 2009; Treder i in., 2009; Pilecki i in. 2009; Treder i in. 2015).

#### PUBLIKACJE:

1. Treder K., Zacharzewska B., Przewodowska A., Przewodowski W., Otulak K. 2015. Ion-exchange membrane chromatography as an alternative method for separation of potato Y virus. *Plant Breeding and Seed Science* 72: 56-67
2. Treder K., Przewodowski W., 2009. The simple method of increasing microplates' adsorbent capacity as an improvement of sensitivity of potato viruses detection by ELISA. *Prog. Plant Prot.* 49, 4: 1767-1769.
3. Treder K., Przewodowski W., Barnyk A. 2009. Factors influencing detection of potato leafroll virus and potato virus Y in potato tuber extracts. *Plant Breed. Seed Sci.* 59: 65-74.
4. Pilecki T., Barnyk A., Przewodowski W., Treder K. 2009. The influence of inhibitors unspecific adsorption of antibodies or conjugates and buffer components on detectability potato viruses in tubers. *Prog. Plant Prot.* 49, 2: 691-695.

#### PROJEKTY:

1. Opracowanie procedury wykrywania infekcji wirusowych w bulwach ziemniaka bezpośrednio po zbiorze lub w stanie spoczynku". 2008-2013. Projekt badawczy MRiRW 4-3-00-7-03. Wykonawca
2. Opracowanie procedury izolacji wirusów roślinnych przy użyciu membranowej chromatografii jonowymiennej". 2011-2014. Projekt naukowy NCN nr N N310 728540. Główny wykonawca.

#### KONFERENCJE:

1. Pilecki T., Lewosz J., Treder K., Barnyk A., Przewodowski W. 2006. Wykrywanie PLRV, PVM, PVS, PVX i PVY w bulwach ziemniaka. (Poster) [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol. Kołobrzeg, 30-31 marca 2006. IHAR ZNiOZ Bonin: 98.
2. Pilecki T., Lewosz J., Treder K., Przewodowski W., Barnyk A. 2007. Możliwości wykrywania PLRV, PVM i PVY w bulwach ziemniaka. (Poster) [W:] III Krajowy Kongres Biotechnologii. Biotechnologia - człowiek i środowisko. Materiały T3: 92.

Bazując na doświadczeniu zdobytym podczas prac związanych z diagnostyką wirusologiczną, rozpocząłem badania w kierunku immunodiagnostyki patogenów bakteryjnych ziemniaka, ze szczególnym uwzględnieniem kwarantannowych bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka. Z uwagi na problemy z diagnostyką bakterii Cms opisane w autoreferacie, patogen wymagał szczególnego podejścia metodycznego umożliwiającego opracowanie rozwiązań diagnostycznych pozwalających uniknąć wyników fałszywych, towarzyszących często zalecanym obecnie metodom detekcji Cms.

Jednym z ważnych wątków badawczych było opracowanie odpowiednich przeciwciał anti-Cms o większej specyficzności względem szczepów Cms i niższym oddziaływaniu niespecyficznym z innymi patogenami ziemniaka oraz drobnoustrojami środowiskowymi. W tym celu opracowano i zastrzeżono sposób uzyskiwania antygenu do immunizacji królików oraz pozyskanie na jego podstawie przeciwciał anti-Cms. Efektem badań było przyznanie dwóch patentów UP RP (Przewodowski i Lewosz, 2012; Przewodowski 2012) oraz realizacja pięciu projektów badawczych, tym trzech przyznanych przez Lokalną Komisję Etyczną (w latach 2008, 2013 i 2018) oraz dwóch z PBwPR MNiRW (w latach 2008-13 i 2014-20). Znaczna część wykonywanych prac związanych z opracowywaniem przeciwciał anty-bakteryjnych skupia się na poszukiwaniu i rozwoju nowych technik izolacji i podnoszenia jakości (czystości, miana i specyficzności) uzyskanych przeciwciał. Jednymi z technik szeroko wykorzystywanych w prowadzonych badaniach są techniki powinowactwa, szczególnie chromatografii kolumnowej oraz membranowej. Wyniki prac prezentowano na trzech konferencjach (Barnyk i in. 2006; Przewodowski i Stochła, 2015; Przewodowski i Przewodowska, 2017) oraz w formie czterech publikacji (Barnyk i in. 2008, Stochła i in. 2014; Stochła i in. 2015 a i b).

#### PATENTY

1. Przewodowski W., Lewosz J. 2012. Sposób usuwania śluzów bakteryjnych. Patent UP RP nr P 210394. .
2. Przewodowski W. 2012. Test immunologiczny na obecność bakterii. Patent UP RP nr P 210395.

#### PUBLIKACJE

1. Barnyk A., Lewosz J., Treder K., Przewodowski W., Pilecki T. 2008. Zastosowanie chromatografii tiofilnej do izolacji przeciwciał poliklonalnych z surowicy krwi królików. *Biul. IHAR*, 248: 87-95.
2. Stochła W., Przewodowski W., Przewodowska A. 2014. Wybrane metody otrzymywania przeciwciał służących do wykrywania i identyfikacji patogenów ziemniaka. *Ziemn.Pol.* 3:46-49.
3. Stochła W., Przewodowska A., Przewodowski W. 2015. Przydatność przeciwciał króliczych uzyskiwanych dwiema metodami do wykrywania *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* testem DAS-ELISA. *Progress in Plant Protection / Postępy w OchronieRoślin* 55: 352-357. DOI: 10.14199/ppp-2015-060
4. Stochła W., Przewodowska A., Przewodowski W. 2015. Wykrywanie bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* przy użyciu przeciwciał króliczych uzyskiwanych dwoma różnymi sposobami. *Prog. Plant Prot.* 55, 3: 352-357

#### PROJEKTY:

1. Wytwarzanie poliklonalnych przeciwciał króliczych na patogeny ziemniaka oraz białka roślinne". 2018-2023. Projekt badawczy LKE nr 10/2018 realizowany na podstawie zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach w Poznaniu. Kierownik.
2. Wytwarzanie przeciwciał poliklonalnych na patogeny ziemniaka i białka roślinne". 2013-2017. Projekt badawczy LKE nr 10/2013 realizowany na podstawie zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach w Szczecinie. Główny wykonawca.
3. Wytwarzanie przeciwciał poliklonalnych na patogeny ziemniaka". 2008-2013. Projekt badawczy LKE nr 10/2008 realizowany na podstawie zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach w Szczecinie. Główny wykonawca.
4. Program Postęp Biologiczny w Produkcji Roślinnej finansowany przez MRiRW. Okres trwania projektu 2008-2013, Projekt badawczy nr 4-3-00-6-01 pt.: „Opracowanie procedur i wytwarzanie materiałów diagnostycznych do wykrywania *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*”. Wykonawca 2008-2010. Kierownik 2011-2013.
5. Badania nad opracowaniem metod selektywnej izolacji oraz czułej identyfikacji bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w trudnych diagnostycznie próbach środowiskowych. 2014-2020. Projekt badawczy MRiRW nr 4-3-00-6-01 pt.. realizowany w ramach programu Postępu Biologicznego w Produkcji Roślinnej, IHAR-PIB Oddział w Boninie. Kierownik.

#### KONFERENCJE

1. Przewodowski W., Stochła W. 2015. Oczyszczanie przeciwciał króliczych metodą powinowactwa. (Poster) [W:] Nasiennictwo i ochrona Ziemniaka, 48 Konferencja naukowo-szkoleniowa. Dźwirzyno, 13-15 maja, Materiały: 87.
2. Przewodowski W., Przewodowska A. 2017. Opracowanie nowej jakości przeciwciał poliklonalnych wykrywających kwarantannowe bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. (Prezentacja) [W:] Nasiennictwo i Ochrona Ziemniaka, 50 jubileuszowa konferencja naukowo-szkoleniowa, Dźwirzyno, 7-9 czerwca, Streszczenia: 37.
3. Barnyk A., Lewosz J., Treder K., Pilecki T., Przewodowski W. 2006. Zastosowanie chromatografii tiofilnej w procesie produkcji zestawów diagnostycznych. (Poster) [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol. Kołobrzeg, 30-31 marca 2006. IHAR ZNiOZ Bonin: 95.

Poza diagnostyką immunologiczną, ważnym elementem mojej działalności naukowej są działania mające na celu usprawnienie diagnostyki molekularnej bakteryjnych patogenów ziemniaka. Dotychczasowe badania prowadzone w tym kierunku związane były z opracowaniem różnych sposobów izolacji kwasów nukleinowych z prób środowiskowych, pozwalających na usunięcie inhibitorów hamujących działanie polimeraz reakcji PCR, badanie wpływu obecności śluzów bakteryjnych zróżnicowanych mukoidalnie bakterii *Cms* na czułość testu PCR, badanie wpływu enzymów litycznych na izolację DNA oraz czułość testu PCR, jak również opracowanie nowoczesnych metod izotermicznej amplifikacji kwasów nukleinowych. Opracowane rozwiązania zaprezentowano na pięciu konferencjach (Przewodowski i in. 2014 a i b; Salamońska i in. 2016; Salamońska i Przewodowski, 2017;

Salamońska i in. 2018) oraz w formie czterech publikacji (Chołuj i Przewodowski, 2014; Przewodowski i in. 2014; Salamońska i in. 2016; Salamońska i Przewodowski, 2018).

#### PUBLIKACJE

1. Salamońska K. i Przewodowski W., 2018. Problem ze zwalczaniem i występowaniem w Polsce bakterii *Ralstonia solanacearum* – sprawcy śluzaka. *Ziemiak Polski* 2: 28-32.
2. Salamońska K., Stochła W., Przewodowski W. 2016. Nowoczesne metody diagnostyczne w identyfikacji molekularnej bakterii kwarantannowych ziemniaka. *Ziemiak Polski* 4: 41-45.
3. Przewodowski W., Chołuj J., Przewodowska A. 2015. Wpływ różnych sposobów izolacji kwasów nukleinowych z bakterii na czułość testu PCR. *Prog. Plant Prot.* 55, 3: 321-326.
4. Chołuj J., Przewodowski W. 2014. Technika PCR i jej modyfikacje w identyfikacji patogenów ziemniaka. *Ziemiak Pol.* 2: 40-45

#### KONFERENCJE

1. Salamońska K., Przewodowski W., Szarek D., Stochła W., Przewodowska A. 2018. Ocena obecności śluzów bakteryjnych w diagnostyce molekularnej zróżnicowanych mukoidalnie szczepów bakterii *Cms*. (Prezentacja) [W:] 51 Konferencja naukowo-szkoleniowa "Nasiennictwo i ochrona ziemniaka", Dźwirzyno, 6-8 czerwca, IHAR-PIB ZNiOZ, Bonin, Streszczenia: 23
2. Salamońska K., Przewodowski W. 2017. Wpływ warunków izolacji DNA na czułość testu molekularnego w diagnostyce sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka. (Prezentacja) [W:] 50 Konferencja naukowo-szkoleniowa "Nasiennictwo i ochrona ziemniaka", Dźwirzyno, 7-9 czerwca, IHAR-PIB ZNiOZ, Bonin, Streszczenia: 39
3. Salamońska K., Przewodowski W., Przewodowska A., Stochła W. 2016. Wpływ enzymów litycznych na izolację DNA oraz czułość testu PCR w diagnostyce kwarantannowych bakterii ziemniaka. (P): *Nasiennictwo i Ochrona Ziemniaka. Konferencja naukowo-szkoleniowa. Dźwirzyno, 11-13 maja. IHAR, ZNiOZ, Bonin: 72-73.*
4. Przewodowski W., Chołuj J., Przewodowska A., Treder K. 2014. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* using Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP). (Poster) [In:] Conference of molecular Plant-Microbe Interactions by International Society of Molecular Plant-Microbe Interactions. 6-11.06.2014 Rodos, Grecja: P209.
5. Przewodowski W., Chołuj J., Przewodowska A., Treder K. 2014. Izotermiczna metoda amplifikacji kwasów nukleinowych LAMP w nowoczesnej diagnostyce sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka. (Referat) [W:] *Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konferencja naukowo-szkoleniowa. Dźwirzyno, 15-16 maja, IHAR-PIB ZNiOZ, Bonin, Streszczenia: 24-25.*

Kolejnym zagadnieniem badawczym mającym na celu usprawnienie diagnostyki bakteryjnych i wirusowych patogenów ziemniaka było opracowanie nowoczesnych materiałów oraz niekonwencjonalnych metod służących do izolacji i identyfikacji bakterii *Cms*, pozwalających na szybszą i czulszą diagnostykę bakterii ziemniaka. W ramach prowadzonych badań, opracowano takie materiały, jak polimery syntetyczne i naturalne, nanocząsteczki metali koloidalnych (m. in. złota, srebra, miedzi i platyny), mikrosfery krzemionkowe modyfikowane nanocząsteczkami koloidu złota. Opracowane nanocząsteczki stosowano zarówno jako podłoże do przeciwciał, jak również jako marker (znacznik) opracowanych przeciwciał. Jednym z ważniejszych etapów badań było opracowanie nowych sposobów chemicznej i biochemicznej modyfikacji powierzchni opracowanych materiałów. Pozwoliło to na kowalencyjne i ukierunkowane osadzanie opracowanych przeciwciał na powierzchni materiałów dokładnie w miejscu aktywacji podłoża. Taki sposób mocowania przeciwciał pozwala na szybsze i bardziej efektywne działanie przeciwciał względem badanego antygenu (komórek bakterii, cząsteczek wirusa, itp.).

Powyższe badania realizowano w ramach dwóch projektów badawczych, PBwPR projektu NCN (2008-11) i PBwPR MRiRW (2008-13) oraz prezentowano na pięciu konferencjach (Lewosz i in. 2005; Przewodowski 2012; Przewodowski i in. 2013; Przewodowski 2013, 2017).

#### PROJEKTY

1. Optymalizacja nowych immunologicznych metod wykrywania bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*". 2008-2011. Projekt badawczy NCN nr N N310 144235. Kierownik.
2. Opracowanie procedur i wytwarzanie materiałów diagnostycznych do wykrywania *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*". 2008-2013. Projekt badawczy MRiRW 4-3-00-6-01. Wykonawca: 2008-2010. Kierownik 2011-2013.

#### KONFERENCJE

1. Przewodowski W. 2017. Opracowanie innowacyjnych materiałów do izolacji i identyfikacji sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka z trudnych diagnostycznie prób środowiskowych. (Prezentacja) [W:] 50 Konferencja naukowo-szkoleniowa "Nasiennictwo i ochrona ziemniaka", Dźwirzyno, 7-9 czerwca.
2. Przewodowski W. 2013. Modern diagnosis of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* based on colloidal gold as sensitive marker. (Presentation) [In:] Classical and molecular approaches in plant pathogen taxonomy. Symposium, Warsaw, Poland, September 10-11, 2013. WULS-SGGW. Book of Abstracts: 30.
3. Przewodowski W., Przewodowska A. and Treder K. 2013. Application of colloidal metal nanoparticles in diagnosis of quarantine bacteria – *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. (Poster) [In:] 10th International Congress of Plant Pathology. Pekin, Chiny. 24-31 września 2013r. *ActaPhytopathologicaSinica* 43 (suppl.): 370.
4. Przewodowski W. 2012. Zastosowanie metali koloidalnych w diagnostyce wirusów. (Prezentacja) [W:] XVI Sympozjum Sekcji Wirusologicznej Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego oraz XXXVIII Konferencji Roboczej Wirusów Roślin Komitetu Ochrony Roślin PAN. Skierniewice, 18-19 września 2012: 33-34.
5. Lewosz J., Pilecki T., Przewodowski W. 2005. Nanoparticles as immunosorbents and markers for detection of potato pathogens. (Poster) [In:] Meeting COST 853, Agricultural biomarkers for array-technology. Sobieszewo June 19-21:56.

Jednym z najważniejszych osiągnięć dotyczących mojej działalności naukowo – badawczej jest opracowanie szeregu nowych metod i testów diagnostycznych służących wykrywaniu patogenów bakteryjnych ziemniaka. Do konstrukcji tych testów użyto wcześniej opracowane, wysoce specyficzne przeciwciała, które w zależności od konstrukcji testu umieszczano na odpowiednio zmodyfikowanych materiałach uzyskując funkcjonalne podłoża do szybkiej i wysoce specyficznej izolacji komórek bakteryjnych. Odpowiedni sposób modyfikacji badanych materiałów pozwolił na ukierunkowany sposób osadzania przeciwciał, stroną aktywną przeciwciała w kierunku antygeny, co pozwoliło na szybką izolację i identyfikację patogenów ziemniaka z dużych objętości, silnie zanieczyszczonych prób środowiskowych typu woda, gleba oraz ekstrakty z tkanek roślinnych. Opracowanie odpowiednich sposobów modyfikacji powierzchni materiałów umożliwiło użycie tych materiałów zarówno w diagnostyce patogenów bakteryjnych, jak i wirusowych, natomiast specjalna konstrukcja materiałów pozwala usunąć w jednym etapie wszystkie niechciane zanieczyszczenia, jak inhibitory reakcji PCR, inne bakterie środowiskowe przerastające podłoża mikrobiologiczne do namnażania *Cms* oraz komponenty tkanek roślinnych, które

zasłaniając pod mikroskopem badane komórki bakteryjne, dają fałszywie negatywny wynik w teście IFAS. Zastosowanie immunopodłoża w opracowanych testach diagnostycznych pozwala uniknąć tych trudności umożliwiając dodatkowo zachowanie żywotności izolowanych komórek bakteryjnych. Izolacja żywych komórek bakterii ma bardzo ważne znaczenie w przypadku konieczności prowadzenia badań dotyczących patogeniczności badanego patogenu. Dodatkowym atutem opracowanych testów jest ich uniwersalność, charakteryzująca się możliwością diagnostyki dowolnego patogenu, w zależności od

Innowacyjność opracowanych testów została potwierdzona przyznaniem szczęściu patentów, w tym czterech polskich (2013) i dwóch międzynarodowych, odpowiednio amerykańskiego (2014) i europejskiego (2016). Wynalazki były prezentowane na Międzynarodowych Targach „BIO International Convention” w Chicago w 2010 roku, natomiast wyniki badań prezentowano na pięciu konferencjach oraz w formie ośmiu publikacji.

Badania dotyczące weryfikacji opracowanych testów wykonałem w ramach projektu LIDER (NCBiR), natomiast ochronę patentową uzyskałem dzięki realizacji projektu OPI finansowanego z funduszy Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (POIG). Badania wykonane w ramach projektu LIDER pozwoliły potwierdzić funkcjonalność oraz przydatność opracowanych rozwiązań w diagnostyce sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka. Opracowane wynalazki zostały również docenione zarówno od strony naukowej, jak i praktycznej na forum ogólnopolskim w 2010 roku poprzez przyznanie 2 wyróżnień w dwóch krajowych konkursach „Fundusze i Nauka” oraz „Jakość Roku 2010”. Ponadto za realizowane prace związane z działalnością naukową oraz uzyskaniem patentów otrzymałem dwie nagrody Dyrektora IHAR-PIB odpowiednio w 2009 i 2013 roku.

#### PATENTY

1. Przewodowski W. 2016. Immunological tests for the presence of bacteria which make use of antibodies obtained using a specific method. Patent europejski przyznany przez EPO nr EP 2 205 735. Ochrona patentowa na terenie Unii Europejskiej
2. Przewodowski W. 2014. Immunological tests for the presence of bacteria which make use of antibodies obtained using a specific method. Patent amerykański przyznany przez USPTO nr US 8,642,275 B2. Ochrona patentowa na terenie USA.
3. Przewodowski W. 2013. Sposób wykrywania obecności bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w analizowanej próbce. Patent UP RP nr P 213858. Ochrona patentowa na terenie Polski.
4. Przewodowski W. 2013. Sposób wykrywania obecności bakterii *Cms* z wykorzystaniem membran poliwęglanowych zawierających immobilizowane przeciwciała. Patent UP RP nr PL 213857. Ochrona patentowa na terenie Polski.
5. Przewodowski W. 2013. Zestaw inkubacyjny do wykrywania albo przyżyciowego izolowania wybranych bakterii, *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Patent UP RP nr PL 213856. Ochrona patentowa na terenie Polski.
6. Przewodowski W. 2013. Zestaw do wykrywania albo przyżyciowego izolowania bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w analizowanej próbce. Patent UP RP nr PL 213855. Ochrona patentowa na terenie Polski.

## PUBLIKACJE

1. Stochła W., Przewodowski W., Przewodowska A., Salamońska K. 2017. Immunodiagnostyczne metody wykrywania i identyfikacji bakteryjnych patogenów ziemniaka. *Ziemniak Polski* 1: 14-20.
2. Salamońska K., Stochła W., Przewodowski W. 2016. Nowoczesne metody diagnostyczne w identyfikacji molekularnej bakterii kwarantannowych ziemniaka *Zienn. Pol.* 2016, 4: 41-45
3. Przewodowski W., Barnyk A. 2010. Nowe metody diagnostyczne do wykrywania fitopatogennych bakterii ziemniaka. *Zienn. Pol.* 1: 33-38.
4. Przewodowski W., Barnyk A. 2009. Rapid test for identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Prog. Plant Prot.* 49, 2: 696-700.
5. Przewodowski W., 2009. Modern methods of diagnostics of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Prog. Plant Prot.* 49, 3: 1335-1343
6. Przewodowski W., Przewodowska A. 2015. New colloidal gold lateral flow strip for rapid detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. (Poster) [In:] 4th International Conference on Bio-Sensing Technology, May 10-13, Lisbon, Portugal: Book of Abstracts: P2.061.
7. Przewodowski W. 2010. Określenie żywotności bakterii Cms w różnych mediach stosowanych w metodach diagnostycznych. (Poster) [W:] XL Sesja Naukowa IOR – PIB, Poznań, 4-5 lutego 2010, *Streszczenia* 50: 257.
8. Przewodowski W., Lewosz J., 2009. Szybki test do identyfikacji bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. (Poster) [W:] XLIX Sesja Naukowa IOR – PIB, Poznań, 19-20 lutego, *Streszczenia* 49: 271.

## PROJEKTY

1. Nowe testy immunologiczne powszechnego stosowania wykrywające bakteriozę ziemniaka”. 2009-2011. Projekt POIG nr POIG.01.03.02-14-013/08 realizowany w ramach Poddziałania 1.3.2 Osi priorytetowej Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, finansowany przez OPI. Kierownik.
2. Nowe narzędzie diagnostyczne o wysokiej czułości i specyficzności do wykrywania i identyfikacji kwarantannowej bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. 2012-2015. Projekt badawczy LIDER nr Lider/28/199/L-3/11/NCBR/2012. Projekt NCBiR w ramach III edycji konkursu LIDER. Kierownik

## KONFERENCJE

1. Przewodowski W. 2013. Nowy test diagnostyczny do identyfikacji kwarantannowej bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. (Referat) [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konferencja naukowo-szkoleniowa. Dźwirzyno, 16-17 maja, IHAR-PIB ZNiOZ, Bonin, *Streszczenia*: 38.
2. Przewodowski W. 2012. Wykrywanie zróżnicowanych mukoidalnie szczepów bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w odniesieniu do testów przesiewowych zalecanych przez EPPO. (Prezentacja) [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol.. Darłówko, 24-25 maja 2012. IHAR - PIB ZNiOZ Bonin: 18-19.
3. Przewodowski W. 2011. Opracowanie i wykorzystanie testu paskowego typu LateralFlow w diagnostyce bakteriozy pierścieniowej ziemniaka. (Prezentacja) [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol.. Darłówko, 19-20 maja 2011. IHAR - PIB ZNiOZ Bonin: 40.
4. Przewodowski W. 2009. Szybki immunologiczny test do identyfikacji bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. (Prezentacja) [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol.. Darłówko, 21-22 maja 2009. IHAR ZNiOZ Bonin: 78.
5. Przewodowski W. 2009. Nowoczesne metody w diagnostyce bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. (Prezentacja) [W:] XLIX Sesja Naukowa IOR – PIB, Poznań, 19-20 lutego 2009, *Streszczenia* 49: 125.

## NAGRODY I WRÓŻNIENIA

1. Nagroda Dyrektora Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin. Przyznana w 2014 roku pismem Dyrektora IHAR-PIB Nr RN-23412014 z dnia 9 grudnia 2014r. za uzyskanie pięciu patentów w 2013 roku w Urzędzie Patentowym RP i jednego patentu w Urzędzie Patentowym USA w 2014 roku.
2. Tytuł „Jakość Roku 2010”. Przyznany w 2011 roku w ogólnopolskim konkursie projakościowym „Jakość Roku” przez Kapitułę złożoną z ekspertów Polskiego Centrum Badań i Certyfikacji (PCBC) w kategorii „Komercjalizacja badań” za projekt pt.: „Nowe testy immunologiczne powszechnego stosowania wykrywające bakteriozę ziemniaka”.
3. Wyróżnienie „Fundusze i Nauka” Przyznane w 2010 roku w ogólnopolskim konkursie „Fundusze i Nauka” za projekt pt.: „Nowe testy immunologiczne powszechnego stosowania wykrywające bakteriozę ziemniaka” realizowany w IHAR - PIB w ramach Poddziałania 1.3.2 Osi priorytetowej Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka.
4. Nagroda Dyrektora Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin Przyznana w 2009 roku pismem Dyrektora IHAR-PIB Nr D - 195/S/2009 z dnia 14 grudnia 2009r. za aktywność, zaangażowanie i wyróżniające wyniki w pracy naukowej w roku 2009.

## 1. Podsumowanie dorobku naukowego

Mój dorobek publikacyjny po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje 28 pozycji, łącznie z 4 pracami dotyczącymi osiągnięcia naukowego (Tabela 1). Wśród nich 18 stanowią oryginalne, opublikowane prace twórcze, z których część opublikowano w liczących się czasopismach zagranicznych, jak *American Journal of Potato Research*, *European Journal Plant Pathology* oraz *PLOS One*. Jestem autorem oraz współautorem 10 patentów o charakterze krajowym i międzynarodowym. Wszystkie opracowane dotychczas wynalazki uznano za oryginalne, czego efektem było przyznanie praw patentowych dla wszystkich dokonanych zgłoszeń, o które aplikowałem. Wyniki realizowanych prac upowszechniałem również uczestnicząc w konferencjach naukowych, szkoleniach i seminariach. Po uzyskaniu stopnia doktora brałem udział łącznie w 27 konferencjach naukowych, w tym 18 krajowych i 10 międzynarodowych, na których wygłosiłem łącznie 21 referatów i zaprezentowałem 22 postery. Jestem beneficjentem dwóch staży naukowych, w tym jednego (11-miesięcznego) zagranicznego oraz jednego (6- miesięcznego) krajowego.

Przygotowałem i powadziłem 8 szkoleń dla pracowników PIORiN oraz producentów ziemniaków, jak również 9 seminariów.

Pracowałem w 4 zespołach eksperckich oraz kierowałem zespołami badawczymi uczestnicząc w realizacji 12-tu projektów krajowych i zagranicznych, w tym w sześciu jako kierownik i ośmiu jako wykonawca lub główny wykonawca. Ważne znaczenie miała realizacja projektów LIDER (NCBiR) oraz POIG (OPI), które pozwoliły uzyskać wiele cennego doświadczenia i wiedzy w kierowaniu zespołami badawczymi i właściwej realizacji projektów. Za aktywność naukową i organizacyjną oraz realizowane projekty i patenty uzyskałem łącznie 6 wyróżnień i nagród.

Wykonywany charakter badań wymagał również samokształcenia i/lub zdobycia odpowiednich kwalifikacji, czego efektem jest dotychczasowe uczestnictwo w 13 kursach doszkalających w kraju i za granicą oraz zdobycie 7 zezwoleń wymaganych w przypadku prac badawczych z organizmami kwarantannowymi oraz zwierzętami laboratoryjnymi. Aktualnie jestem członkiem 3 organizacji naukowych, sześciu sieci/konsorcjów badawczych, Rady ds. Młodych Naukowców IHAR-PIB oraz Rady Doradczej Pomorskiego Ośrodka Doradztwa Rolniczego. 20 czerwca decyzją Rady Naukowej IHAR-PIB zostałem promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim mgr M. Pietraszko przygotowującej pracę na temat epidemiologii bakteriozy pierścieniowej ziemniaka.

Tabela 1. Liczbowe zestawienie dorobku naukowego przed i po uzyskaniu stopnia doktora.

Wyszczególnienie	Liczba		
	Przed doktor.	Po doktor.	Razem
<b>Oryginalne opublikowane prace twórcze</b> (w tym na liście Filadelfijskiego Instytutu Informacji Naukowej z IF)	1	18	19
<b>Prace przeglądowe i opracowania popularno-naukowo-upowszechnieniowe</b>	-	9	9
<b>Monografie</b> (autor i/lub współautor)	-	1	1
<b>Zgłoszenia patentowe i uzyskane patenty, w tym</b>	4	15	19
• Zgłoszenia i patenty krajowe	4 (2 i 2)	12 (6 i 6)	16 (8 i 8)
• Zgłoszenia i patenty międzynarodowe	-	3 (1 i 2)	3 (1 i 2)
<b>Punkty za publikacje i patenty (wg MNiSW) ) (Rok wyd)</b>	33	506	539
<b>Punkty za publikacje i patenty (wg MNiSW) (2016)</b>	35	575	610
<i>Impact factor</i> publikacji (wg MNiSW) ) (Rok wyd)	-	6,700	6,700
<i>Impact factor</i> publikacji (wg MNiSW) (2016)	-	6,823	6,823
Liczba cytowania dla publikacji wg bazy WoS	13		
Indeks Hirscha wg bazy WoS	1		
Liczba cytowania dla publikacji wg bazy Google Scholar	20		
Indeks Hirscha wg bazy Google Scholar	3		
Prace badawcze i doniesienia opublikowane w wydawnictwach z kongresów i konferencji, w tym:	10	46	56
• recenzowane	3	12	15
• umieszczone w suplementach czasopism	1	4	5
• streszczenia	6	30	36
Wykłady i referaty wygłoszone na seminariach i konferencjach:	14	48	62
• międzynarodowych	-	10	10
• ogólnopolskich	9	18	27
• na uczelniach i w innych jednostkach naukowych	3	12	15
• seminaria szkoleniowe	2	8	10
<b>Członkostwo w organizacjach naukowych</b>	-	3	3
<b>Członkostwo w radach naukowych i innych organizacjach poza naukowych</b>	-	2	2
<b>Granty ze środków unijnych</b>	1	2	3
<b>Granty krajowe</b> (kierowanie i/lub wykonawstwo), w tym:	2	10	12
• ze środków MNiSW	2	3	5
• z innych środków	-	7	7
<b>Udział w zespołach eksperckich i konkursowych</b> (w tym udział w wykonaniu ekspertyz):	-	4	4
<b>Wykonane recenzje:</b>	-	11	11

\* Z uwagi na brak oddziaływania współczynnika IF na patenty, w pozycjach dotyczących patentów nie zamieszczano jego wartości.

Włodzisław Przeworski