



Poznań, dnia 05.01.2023 r.

Dr hab. inż. Romuald Gwiazdowski  
Centrum Badań Rejestracyjnych Agrochemikaliów  
Instytutu Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy w Poznaniu

#### RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Joanny Kowalskiej  
pt.: „Ocena oddziaływania czynników formulacyjnych na stabilność i efektywność działania  
preparatów mikrobiologicznych przeznaczonych do zastosowania w rolnictwie ekologicznym  
i konwencjonalnym”

napisanej w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności  
na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu  
pod kierunkiem prof. UPP dr hab. Wojciecha Białasa

*Recenzja została przygotowana na podstawie pisma z dnia 04.11.2022 r. wystosowanego przez Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo, prof. dr hab. Andrzeja Blecharczyka.*

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska powstała w wyniku realizacji konkursu w programie MNiSW „Doktorat wdrożeniowy”, a jej celem było opracowanie stabilnych preparatów mikrobiologicznych przydatnych w rolnictwie do wspomagania wzrostu i rozwoju roślin uprawnych. Wykorzystanie mikroorganizmów jako składników preparatów znajdujących zastosowanie w rolnictwie staje się w ostatnich latach coraz bardziej popularne. Jest to również zgodne z polityką Unii Europejskiej i założeniami integrowanej produkcji roślin zmierzającymi do ograniczenia agrochemikaliów i zwiększenia stosowania w uprawie roślin preparatów przyjaznych dla środowiska. Obserwuje się również wzrost zainteresowania konsumentów produktami pochodzącymi z upraw ekologicznych. Mikroorganizmy mogą wpływać na rozwój roślin w sposób bezpośredni m.in. poprzez syntezę składników odżywczych, wytwarzanie hormonów roślinnych, zwiększanie rozpuszczalności fosforanów czy zwiększanie pobierania żelaza, jak również pośrednio poprzez zapobieganie rozwojowi patogenów roślin. Z uwagi na różny mechanizm działania drobnoustrojów, na rynku pojawiają się bionawozy, biostymulatory czy biopestycydy, a poszukiwanie mikroorganizmów o określonych właściwościach budzi coraz większe zainteresowanie środowisk naukowych i producentów preparatów dla rolnictwa. Należy zatem podkreślić, że praca Doktorantki doskonale wpisuje się w aktualne trendy naukowe i rynkowe. Jednocześnie stanowi kompleksowe podejście do tematu, skupiając się na opracowaniu preparatu/preparatów, począwszy od poszukiwania w środowisku mikroorganizmów o określonej aktywności biologicznej po przygotowanie formulacji preparatu.

#### FORMALNA OCENY PRACY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska liczy 305 stron i ma strukturę typową dla prac o charakterze doświadczalnym. Wyróżniono w niej: streszczenie, wprowadzenie stanowiące przegląd

literatury, obszerną część doświadczalną zawierającą metodykę oraz wyniki i dyskusję, wnioski, spisy tabel i rycin, załączniki oraz spis literatury. Wprowadzenie obejmuje 12 podrozdziałów i liczy 57 stron, natomiast część doświadczalna poprzedzona zdefiniowanym celem pracy obejmuje 179 stron. Spis literatury obejmuje 271 pozycji, przy czym są to głównie publikacje obcojęzyczne. W pracy znajduje się 100 tabel i 89 rycin. W pracy znajduje się również 7 załączników. Układ pracy jest logiczny i typowy dla tego typu opracowań badawczo-naukowych.

### MERYTORYCZNA OCENY PRACY

**Tytuł pracy** skupia się na wpływie czynników formulacyjnych na stabilność i efektywność działania opracowywanych preparatów mikrobiologicznych, jednak po przeczytaniu pracy nasuwa się refleksja, że tytuł nie oddaje w pełni jej zawartości a odnosi się tylko do fragmentu. Ponadto, Doktorantka w pracy skupiała się raczej na skuteczności działania a nie efektywności, która mówi o relacji uzyskanych efektów do poniesionych nakładów chyba, że tytuł odnosi się wyłącznie do ostatniego rozdziału.

**Wykaz skrótów** jest bardzo dokładny, jednak opracowany w sposób niekonsekwentny. Niektóre skróty mają podane rozwinięcie w języku angielskim, inne nie. Oczywiście, nie wszystkie skróty wymagają takiego rozwinięcia (jak Fe, K czy RNA), ale brak jednolitego podejścia jest widoczny w odniesieniu do nazw związków. Przykładowo, kwas bichonionowy posiada rozwinięcie nazwy w języku angielskim, a kwas absycynowy czy indoliloctowy już nie.

**Przegląd literatury** zawarty w rozdziale zatytułowanym *Wprowadzenie* obejmuje 12 podrozdziałów, w których Autorka charakteryzuje ryzosferę oraz ryzobakterie promujące wzrost roślin (PGPR – z ang. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) wraz z mechanizmem ich oddziaływania na rośliny, a następnie koncentruje się na biopreparatach i tworzeniu preparatów mikrobiologicznych z uwzględnieniem składników i parametrów istotnych w procesie ich otrzymywania. Jest to obszerne opracowanie, w którym poszczególne zagadnienia są odpowiednio dobrane i ułożone w logicznej kolejności, stanowiąc dobre wprowadzenie do części doświadczalnej. Na podkreślenie zasługuje aktualna i bardzo rozbudowana baza literaturowa, co dowodzi dobrej znajomości krajowego i światowego dorobku naukowego w realizowanej tematyce. W tej części największe wątpliwości budzi niekonsekwentne stosowanie niektórych pojęć, takich jak „bionawozy”, „biostymulatory” czy „biopestycydy”, które w zależności od rozdziału są definiowane jako produkty, czyli preparaty zawierające mikroorganizmy, a w innych są utożsamiane wprost z mikroorganizmami. Przykładowo, na str. 19 Doktorantka pisze, że „Mikroorganizmy posiadające mechanizmy ułatwiające pobieranie składników odżywczych (...) są powszechnie nazywane bionawozami”. Natomiast na str. 23 w tabeli 2 i na str 54 definiuje bionawozy jako substancje zawierające żywe mikroorganizmy, wskazując, że do tej grupy są zaliczane również preparaty zawierające witaminy czy aminokwasy. Wydaje się, że zastosowane w odniesieniu do tabeli 2 zbyt bezpośrednie tłumaczenie z języka angielskiego, powielane niekiedy w tekście, wprowadza zbyt uproszczenie w tej kwestii. Niepotrzebne wydaje się zbyt duże rozdrobnienie części literaturowej na poszczególne rozdziały, szczególnie, że niektóre z nich mogłyby z powodzeniem stanowić podrozdziały wspólnego rozdziału. Przykładowo, rozdziały 1.7 do 1.9 mogłyby zostać włączone do rozdziału 1.6., w którym Autorka zaznacza, że „proces formułowania produktu końcowego polega na zmieszaniu składnika mikrobiologicznego z różnymi

nośnikami i adiuwantami...". Przez zastosowany układ części literaturowej niejasne jest powiązanie rozdziału 1.4. „Rozkład masy ligninocelulozowej” z pozostałymi rozdziałami. Zrozumiałe, że nie jest ujęty jako mechanizm działania PGPR, jednak brak chociaż zdania wprowadzającego, które wyjaśniłoby, dlaczego poruszono ten temat. Należy podkreślić, że część literaturowa została opracowana z dużym poziomem szczegółowości, chociaż nie jest on równomierny dla całego rozdziału, przez co niektóre fragmenty są bardzo rozbudowane, a inne jedynie zarysowane w stopniu ogólnym. Moim zdaniem, niepotrzebne w tej części pracy są rysunki, które zasadniczo nie wnoszą zbyt wiele, a na dodatek nie są samodzielnym dziełem Autorki, zostały tylko przekopiiowane bezpośrednio z artykułów. Tym samym niektóre rysunki mają opisy elementów w języku polskim, a inne w języku angielskim, co wygląda niespójnie. Pomimo wspomnianych uwag, przegląd literatury uwzględnia treści w pełni uzasadniające podjęcie badań nad opracowaniem preparatu mikrobiologicznego, dlatego **należy uznać wybór tematu pracy przez Doktorantkę za uzasadniony z naukowego, poznawczego i aplikacyjnego punktu widzenia.**

**Cel pracy** został przedstawiony najpierw na stronie 14 jako opracowanie stabilnych preparatów mikrobiologicznych, które będą wykorzystywane w rolnictwie do wspomagania wzrostu i rozwoju roślin uprawnych, a następnie w postaci rozbudowanej na stronie 76. Generalnie, cele zostały sformułowane w sposób jasny i korespondujący z tytułem pracy, jednak Autorka mogła wyodrębnić cel główny i cele szczegółowe dla większej przejrzystości. W pracy nie zawarto natomiast hipotez, typowych dla opracowań o charakterze naukowym, które powinny zostać sformułowane i weryfikowane w oparciu o uzyskane wyniki.

**Metodyka pracy** stanowi bardzo obszerną część, obejmuje dwa rozdziały: *Materiały i Metody* (w domyśle zapewne *Metody badawcze*?) i została opracowana z dużą skrupulatnością. Należy przy tym podkreślić dużą różnorodność zastosowanych metod, co niewątpliwie wymagało od Doktorantki opanowania wielu technik i zapewne było czasochłonne i pracochłonne. Niewątpliwie dobrym posunięciem przy tak dużej liczbie przeprowadzonych badań było zamieszczenie schematu przeprowadzonych badań (str. 92), szkoda jednak, że Autorka nie dodała w opisach poszczególnych etapów, ile izolatów bakterii poddawano badaniom w każdym z nich. Wydaje się również, że w opisie etapu dotyczącego skringu mikroorganizmów środowiskowych, lepiej byłoby podać, że dotyczył on „wybranych właściwości” mikroorganizmów lub „aktywności biologicznej” zamiast „wybranych aktywności”. Mimo dużej dokładności opisów poszczególnych metod Autorka bywa niekonsekwentna. Z reguły każdy opis zastosowanej metody ma wskazany cel jej wykorzystania w pracy, chociaż zdarza się, że nie jest on wskazany jak np. w rozdziale 4.3. *Oznaczenie liczebności komórek* na str. 95. Niewłaściwy jest również tytuł rozdziału „*Badania biologiczne*” odnoszący się do określenia wpływu badanych mikroorganizmów na wzrost i rozwój roślin uprawnych, ponieważ jest tak ogólny, że nie wskazuje na zakres badań. Duże wątpliwości w części metodycznej budzi dobór mikroorganizmów do oceny właściwości przeciwdrobnoustrojowej wybranych izolatów. Większość bakterii wskaźnikowych to typowe patogeny żywności, a z kolei gatunki *Rhizobium nepotum* czy *Rhizobium radiobacter* są w literaturze wskazywane jako mikroorganizmy wspomagając wzrost i rozwój roślin, charakteryzowane jako mikroorganizmy kategorii I w klasyfikacji organizmów patogennych. W przypadku grzybów uwzględniono gatunki *Aspergillus flavus* i *A. niger*, które wydają się mieć większe znaczenie z punktu widzenia przechowywania surowców czy produktów aniżeli ich

udziału w rozwoju roślin na polu. Ponadto, zważywszy na obszerność opracowania, Autorka mogła pominąć w opisach niektóre szczegóły, jak np. dokładna procedura barwienia metodą Grama (str. 96) czy Scheaffera-Fultona (str. 97) czy opis procedury izolacji DNA genomowego z komórek bakterii (str. 108 – 109), który był przeprowadzany przy użyciu komercyjnego zestawu do izolacji i procedura ta jest standardowym elementem zestawu.

Czytając metodykę pracy nasuwa się również kilka pytań:

- Dlaczego wyniki skriningu na podłożach stałych w zakresie solubilizacji wybranych pierwiastków podawane są w różny sposób – dla fosforu i wapnia jako różnica między średnicą strefy przejaśnienia a średnicą kolonii, a dla cynku i potasu jako promień strefy? Z opisu metodyki wynika, że postępowano w analogiczny sposób. Dla krzemu ta informacja nie została podana w metodyce (str. 102)
- Czym kierowano się dobierając gęstość optyczną do poszczególnych etapów badań? Przykładowo w badaniach dotyczących ilościowej oceny zdolności mikroorganizmów do solubilizacji fosforu stosowano gęstość optyczną odpowiadającą liczebności komórek na poziomie  $1 - 2 \times 10^9$  jtk/ml, a cynku czy potasu  $3 \times 10^8$  jtk/ml. Czy gęstość ta była ustalana doświadczalnie czy opierała się na skali MacFarlanda?
- Czym kierowano się dobierając zestaw mikroorganizmów do oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej wybranych izolatów bakterii, określanych przez Autorkę jak PGPR? (str. 129 – 130)

**Wyniki i dyskusja** to bardzo rozbudowana część pracy, ułożona w logiczny ciąg doświadczeń. Doktorantka przeprowadziła najpierw wieloetapowy skrining wyizolowanych bakterii, który obejmował ocenę wybranych właściwości zakończony identyfikacją wyselekcjonowanych izolatów. Kolejne etapy obejmowały optymalizację warunków hodowli wybranych bakterii, badania nad powiększeniem skali hodowli i opracowaniem preparatów z uwzględnieniem różnych czynników kształtujących ich skład. Na koniec Doktorantka podjęła się oceny aspektów techniczno-ekonomicznych produkcji biomasy wybranego szczepu. Analizując tę część pracy należy podkreślić ogromne zaangażowanie Doktorantki w realizację badań, które zostały szeroko zakrojone i wymagały zarówno dobrego zorientowania w aktualnych badaniach naukowych, jak i opanowania wielu technik i metod pozwalających na przeprowadzenie doświadczeń. Widać przy tym, że Doktorantka wykazała się dużą dociekliwością naukową.

Nasuwa się natomiast kilka kwestii, które w mojej ocenie zostały trochę niedopracowane. W pierwszej części pracy Doktorantka dość swobodnie i wymiennie posługuje się pojęciami „szczep” i „izolat”, choć na etapie skriningu powinna raczej posługiwać się pojęciem „izolat”, nie mając jeszcze żadnej wiedzy dotyczącej przynależności gatunkowej badanych mikroorganizmów. W przeprowadzonym skriningu Autorka uwzględniła rozkład ligniny i celulozy, jednak nie wyjaśniła, jaki był zamysł wykonania tego etapu. Z jednej strony wskazuje w celu na poszukiwanie mikroorganizmów korzystnie wpływających na rozwój roślin, a z drugiej w opisie doświadczeń dotyczących rozkładu ligniny i celulozy podkreśla, że udział mikroorganizmów w tym procesie ma znaczenie dla rozkładu odpadów i obiegu pierwiastków w przyrodzie. Można się jedynie domyślać, że uwzględnienie takich właściwości wyizolowanych mikroorganizmów może mieć znaczenie w kwestii użyzniania gleby, jednak nie zostało to wyraźnie wskazane w tekście. Wzmianka pojawia się dopiero we wnioskach, ale brak



jednoznacznego wskazania. Autorka poświęciła dużo uwagi optymalizacji warunków hodowli wybranych mikroorganizmów, uwzględniając dobór podłoża do przetrwalnikowania bakterii z rodzaju *Bacillus*, dobór warunków hodowli wybranych szczepów z rodzaju *Bacillus*, *Paenibacillus* i *Pseudomonas* oraz powiększanie skali hodowli. Jest to cenny materiał z punktu widzenia produkcji biomasy, często brakuje jednak wyjaśnienia, dlaczego podjęto pewne działania albo wskazania, co stało za dokonaniem wyborem na poszczególnych etapach. Przykładowo, ocenę wytwarzania przetrwalników wykonano dla siedmiu szczepów z rodzaju *Bacillus*, natomiast dalsze badania prowadzono z wykorzystaniem dwóch szczepów, brakuje wyraźnej informacji, co stało za tym wyborem. Podobnie, w badaniach nad kinetyką solubilizacji fosforu przez bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, przeprowadzono doświadczenia z każdym ze szczepów z osobna jak również w postaci konsorcjum. Z jednej strony wyniki solubilizacji fosforu przez konsorcjum bakterii wydają się być bardzo satysfakcjonujące, z drugiej jednak zaobserwowano gwałtowny spadek liczby komórek. Autorka nie odniosła się wyraźnie do uzyskanych wyników i nie wskazała czy łączenie szczepów jest korzystne czy niekoniecznie zważywszy, że dalsze badania prowadzono osobno dla każdego szczepu. Cenne z punktu widzenia zastosowania opracowywanych produktów są badania dotyczące oceny wpływu wybranych mikroorganizmów na wzrost i rozwój roślin, chociaż jak sama Autorka zauważyła, badania takie powinny objąć kilka okresów wegetacyjnych dla prawidłowego wnioskowania a w moim przekonaniu powinny to być badania polowe. Doświadczenia przeprowadzone z udziałem granulatów i zapraw zawierających wybrane szczepy wskazały na pewien pozytywny wpływ bakterii na oceniane parametry. Autorka podeszła jednak do interpretacji wyników niezbyt precyzyjnie. W odniesieniu do wyników zawartych w tabelach 85 i 87, uwzględniając analizę statystyczną, należało sprecyzować, że pozytywny wpływ mikroorganizmów jest widoczny wyłącznie w porównaniu z wariantem kontrolnym i/lub wskazać na pewne tendencje w kierunku zwiększenia wysokości czy masy części nadziemnej roślin. Trudno również jednoznacznie pisać o zwiększeniu wskaźnika NBI (tab. 91), choć tu Autorka zwróciła uwagę na brak potwierdzenia tego faktu w analizie statystycznej.

Czytając opis wyników nasuwa się również kilka pytań:

- Dlaczego tylko 11 spośród 45 izolatów bakterii poddano identyfikacji genetycznej?
- Dlaczego w ocenie mikroskopowej wykonywanej w celu obserwacji przetrwalników zamiennie stosowano metody barwienia Grama i Schaeffera-Fultona, skoro metodą dedykowaną do obserwacji jest raczej ta druga? Słaba jakość fotografii nie pozwala czytelnikowi ocenić czy były równie przydatne w ocenie przetrwalnikowania.
- Czym był uzasadniony dobór nośników dla bakterii z rodzajów *Bacillus* i *Pseudomonas* w procesie opracowywania formulacji?
- Jaki był zamysł dołączenia badań dotyczących właściwości przeciwdrobnoustrojowych na etapie opracowywania preparatów tym bardziej, że są to badania typowo laboratoryjne, a nie obserwacje na roślinach?

**Wnioski** nie mają charakteru typowych wniosków przez długie wprowadzenie i zakończenie, które zawiera jednak istotne informacje, mogące stanowić część odrębnego podsumowania. Przy tak dużej ilości badań dodanie podsumowania, w którym Autorka mogłaby uzasadnić wybory dokonywane na poszczególnych etapach i wyjaśnić znaczenie osiągniętych wyników, byłoby wskazane. Częściowo informacje te znajdują się w streszczeniu, jednak jak podkreślono już wcześniej w wielu momentach



wyraźnie brakuje wyjaśnienia, dlaczego podjęto takie, a nie inne kroki, co przy tak obszernym zakresie badań pozwoliłoby usystematyzować pracę.

### UWAGI OGÓLNE

W całej pracy brakuje wyraźnego ukierunkowania przeprowadzonych badań. Poszukiwanie mikroorganizmów „przydatnych do zastosowania w rolnictwie..” to zbyt ogólne stwierdzenie, bo nie jest do końca jasne czy chodzi o mikroorganizmy, które wejdą w skład bionawozów czy biostymulatorów. Uwzględnienie w badaniach oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej wybranych szczepów jest również niejasne w kontekście prowadzonych badań, bo sugeruje zastosowanie ich jako alternatywy dla chemicznych środków ochrony roślin w postaci biopestycydów. W części teoretycznej pracy pojawia się wprawdzie kategoria „preparatów mikrobiologicznych”, jednak ich definicja jest mało precyzyjna, a jako przykład podano preparat Efektywne Mikroorganizmy, którego jakość i działanie budzą wiele wątpliwości. Jaki zatem charakter mają mieć opracowywane preparaty?

Praca została przygotowana starannie z dużą dbałością o estetykę, jednak Autorka nie ustrzegła się drobnych błędów, które nie obniżają jednak wartości merytorycznej pracy. Kilka przykładów podano poniżej:

Str 14 – „Identyfikacji za pomocą techniki reakcji amplifikacji PCR fragmentu genu...” - wystarczyłoby „techniki PCR”,

str 92 – użycie określenia „mikroflora” – powinno być zastąpione słowem „mikrobiota”

str. 93, 94 (wielokrotnie powtarzane) – „gram-dodatnie” i „gram-ujemne” – powinno być Gram-dodatnie i Gram-ujemne z dużej litery

str. 129 (m.in.) – „aktywność antymikrobiologiczna” – błędne określenie będące zapewne zbyt dosłownym tłumaczeniem z języka angielskiego - zdecydowanie lepiej użyć określenia „aktywność przeciwdrobnoustrojowa”

str. 139 - „... z rodzaju *Bacillus megaterium*...” – powinno być „z gatunku..”

str. 226 „Badacze formułowali bakterie z rodzaju *Bacillus* na różnych nośnikach...” – kolokwializm, zamiast tego powinno być np.: „opracowywali formułę/skład z udziałem bakterii z rodzaju *Bacillus*...”

### PODSUMOWANIE

Podsumowując, należy stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Aleksandry Joanny Kowalskiej pt.: „Ocena oddziaływania czynników formułacyjnych na stabilność i efektywność działania preparatów mikrobiologicznych przeznaczonych do zastosowania w rolnictwie ekologicznym i konwencjonalnym” mieści się w zakresie dyscypliny naukowej Rolnictwo i Ogrodnictwo.

Na uznanie zasługuje szeroki zakres badań przeprowadzonych przez Doktorantkę, wnikliwa analiza wyników i ich dyskusja, co świadczy o dużej umiejętności korzystania z dorobku naukowego, planowania i realizacji badań. Część doświadczalna jest ułożona w sposób logiczny pozwalając na osiągnięcie założonego celu. Autorka wykorzystwała odpowiednio dobrane metody badawcze, aby konsekwentnie zrealizować zaplanowane etapy badań. Należy również podkreślić aplikacyjny charakter pracy, co jest zgodne z założeniami doktoratu wdrożeniowego. Pod względem merytorycznym pracę oceniam wysoko, a wymienione wcześniej uwagi mają charakter dyskusyjny



i mogą posłużyć Doktorantce w przygotowaniu naukowych opracowań w przyszłości. Podobnie, wspomniane błędy językowe czy niefortunne sformułowania nie wpływają na wartość naukową i aplikacyjną pracy.

Po zapoznaniu się z przedstawioną do oceny rozprawą doktorską mgr inż. Aleksandry Joanny Kowalskiej stwierdzam, że w pełni spełnia ona wszelkie wymogi formalne określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668). W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr inż. Aleksandry Joanny Kowalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Romuald Gierdzowski*