

prof. dr hab. inż. Joanna Puławska
Instytut Ogrodnictwa - PIB
Zakład Ochrony Roślin
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3
96-100 Skierniewice

Skierniewice 16.01.2023

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

wykonanej w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

promotor prof. UPP dr hab. Wojciech Białas
promotor pomocniczy dr Katarzyna Góralska

Uzasadnienie wykonania recenzji

Uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu powołano mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Aleksandry Joanny Kowalskiej (pismo Przewodniczącego Rady z dnia 4.11.2022).

Jednocześnie oświadczam, że tematyka rozprawy doktorskiej jest zgodna z moją specjalizacją naukową, nie jestem współautorem prac naukowych Doktorantki, nie prowadziłam i nie prowadzę wspólnie prac naukowych i jak dotąd nie brałam udziału w postępowaniach o awans naukowy Kandydatki.

Podstawowe dane o Kandydatce do stopnia doktora

Doktorantka uzyskała tytuł magistra inżyniera w dniu 27.06.2017 roku na kierunku studiów Biotechnologia, Wydziału Rolnictwa i Bioinżynierii, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Od 2017 roku, z dziewięciomiesięczną przerwą, podczas której była zatrudniona na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu, pracuje w firmie Intermag Sp. z o.o. w Olkuszu na



stanowisku mikrobiologa. W tym czasie ukończyła podyplomowe studium na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu „Zarządzanie Jakością i Bezpieczeństwem Żywności”.

Struktura pracy – ocena formalna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Aleksandry J. Kowalskiej pt. „Ocena oddziaływania czynników formulacyjnych na stabilność i efektywność działania preparatów mikrobiologicznych przeznaczonych do zastosowania w rolnictwie ekologicznym i konwencjonalnym” została wykonana w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, pod kierunkiem dr. hab. Wojciecha Białasa, prof. UPP jako promotora i dr Katarzyny Góralskiej w roli promotora pomocniczego. Badania były prowadzone we współpracy z firmą Interomag Sp. z o.o., pracodawcą Doktorantki, a doktorat jest doktoratem wdrożeniowym. Rozprawa doktorska objęta jest klauzulą tajności ze względu na tajemnicę prawnie chronioną przedsiębiorstwa. Przedstawiona rozprawa doktorska posiada klasyczną formę obejmującą **Streszczenie** w wersji polskiej i angielskiej, **Wprowadzenie** w formie przeglądu literatury w zakresie tematyki doktoratu, części doświadczalnej obejmującej rozdziały **Materialy**, **Metody**, poprzedzonej sprecyzowaniem **Celu pracy** oraz rozdziały **Wyniki i dyskusja** i **Wnioski**. Praca jest uzupełniona o wykaz skrótów, spis tabel, rycin, załączniki i spis literatury. Rozprawa obejmuje 305 stron maszynopisu, zawiera 100 tabel umieszczonych w tekście i 7 jako załączniki, 89 rycin i 271 cytowanych źródeł literaturowych. Praca doktorska mgr inż. Aleksandry J. Kowalskiej to bardzo obszerne opracowanie jednak o bardzo przejrzystej strukturze i przedstawione w sposób systematyczny. Pewne wątpliwości budzi jednak tytuł rozprawy, ponieważ nie obejmuje on całego zakresu merytorycznego pracy, a tylko jej fragment dotyczący oddziaływania czynników formulacyjnych na stabilność i efektywność preparatów. Powinien być on sformułowany bardziej ogólnie tak aby obejmować również część dotyczącą izolacji i charakterystyki mikroorganizmów, ponieważ to obszerna i istotna część pracy stanowiąca bazę do wszystkich badań.

Ocena merytoryczna

Streszczenie w j. polskim i jego wersja angielska, są syntetycznym opisem prac jakie wykonała Doktorantka. Generalnie jest poprawnie napisane, jednak w wersji polskiej wkradł się błąd. Doktorantka napisała, że wyizolowane bakterie były poddane „identyfikacji za pomocą techniki amplifikacji PCR fragmentu genu 16S rRNA”, a sama amplifikacja tego rejonu DNA nie pozwala na identyfikację bakterii. Amplifikowany fragment powinien być poddany sekwencjonowaniu i dopiero analiza sekwencji pozwala na identyfikację.

Wprowadzenie zawierające przegląd literatury jest bardzo obszerne - zajmuje 58 stron. Doktorantka starała się przedstawić bieżący stan wiedzy dotyczący każdego z aspektów jej pracy sięgając po najnowsze prace naukowe. Oceniając tę część rozprawy stwierdzam, że jest ona napisana w sposób wyczerpujący temat i tekst ten mógłby być opublikowany w formie pracy przeglądowej. Niemniej jednak przed publikacją warto byłoby tę część poprawić w pewnym zakresie. Doktorantka, opisując poszczególne grupy mikroorganizmów posiadające różne cechy biologiczne, często używa sformułowania, że największe zdolności w zakresie danej aktywności mają bakterie z określonych rodzajów. Jest to dużym uproszczeniem i nie zawsze prawdą, ponieważ poszczególne szczepy danego rodzaju lub nawet gatunku mogą się bardzo różnić cechami fenotypowymi, które nie są zależne od produktów genów metabolizmu podstawowego. Tutaj poprawnym określeniem byłoby sformułowanie szczepy z rodzajów/gatunków. Również stwierdzenie, że antybiotyki produkowane są głównie przez bakterie z rodzaju *Pseudomonas* i *Bacillus* nie jest prawdziwe, ponieważ antybiotyki mogą być produkowane przez wiele różnych rodzajów bakterii.

Cele pracy ujęte w 6 punktach są sformułowane poprawnie i zawierają cały zakres pracy. Rozdział **Materialy** obejmuje 16 stron i zawiera skrupulatny opis wszystkich odczynników, podłoży, buforów itp., a także wykaz aparatury jaka była używana w czasie prac. W rozdziale **Metody**, obejmującym 40 stron, dokładnie opisano każdą z metod jaka była stosowana w czasie badań. Generalnie metodyka badawcza została dobrze dobrana do realizacji planowanych celów pracy. Mam jednak zastrzeżenie, że nie przy wszystkich opisanych metodach wykorzystanych w badaniach podani są autorzy danej metody z referencją do publikacji oryginalnie ją opisującej. W metodyce powinna też być podana firma produkująca dane odczynniki na przykład polimerazy do amplifikacji DNA czy zestaw do izolacji DNA z żeli. Kolejna uwaga dotyczy sposobu identyfikowania szczepów na podstawie sekwencji 16S rRNA (rozdział 4.10.1). Doktorantka robiła to przez porównanie otrzymanej sekwencji z sekwencjami zdeponowanymi w GenBanku za pomocą algorytmu BLAST. Niestety w GenBanku zdeponowanych jest wiele sekwencji niewłaściwie opisanych, a proces identyfikacji powinien polegać zawsze na porównaniu badanej sekwencji do sekwencji szczepów typowych danego gatunku i tutaj dobrym oprogramowaniem jest EzTaxon, który jest bazą danych dla sekwencji 16S rRNA tylko typowych szczepów różnych gatunków i identyfikacja z zastosowaniem tego oprogramowania daje większe prawdopodobieństwo poprawnej identyfikacji. Następna uwaga dotyczy również metodyki. Przy badaniu aktywności przeciwbakteryjnej pozyskanych szczepów Doktorantka podaje, że płytki z bakteriami

inkubowano w temperaturze 37°C przez 2 dni. Taka temperatura nie jest optymalną temperaturą wzrostu dla wszystkich użytych w tym badaniu gatunków bakterii, a tylko dla niektórych. Czy jest to pomyłka czy rzeczywiście inkubacja była prowadzona tylko w temperaturze 37°C?

W kolejnym rozdziale, czyli w rozdziale **Wyniki i dyskusja**, Doktorantka szczegółowo opisuje uzyskane rezultaty badań. Rozdział ten zaczyna się od opisu wyników dotyczących izolacji mikroorganizmów. Autorka deklaruje, że wyizolowała w czasie pracy 400 szczepów, a spośród nich wybrała losowo 80 do realizacji badań. Moje pytanie brzmi, w jaki sposób uzyskano losowość wyboru? Czy Doktorantka może kierowała się jakimiś przesłankami podczas wyboru izolatów? Kolejna uwaga, która nasunęła mi się podczas lektury rozprawy to to, że chociaż Doktorantka deklaruje w rozdziale 5.1, że do dalszych badań wytypowała 80 izolatów, w poszczególnych tabelach wynikowych pojawia się mniejsza ich liczba, na przykład 75 lub mniej zależnie od testu. Co jest tego przyczyną?

W opisie wyników w punkcie 5.5.3.2 „Formulacja na nośnikach stałych” widnieje informacja, że w tabelach od 69 do 74 są przedstawione wyniki dotyczące przeżywalności bakterii na poszczególnych nośnikach po procesie suszenia formulacji. Podany tu jest też wzór na obliczanie przeżywalności, jednak w tabelach od 69 do 72, w drugiej i trzeciej kolumnie istnieje opis taki jak „aw przed suszeniem” i „aw po suszeniu”, a w czwartej kolumnie widnieją dane dotyczące przeżywalności bakterii. Przede wszystkim, pod tabelą powinien być wyjaśniony skrót „aw”, ponieważ możemy się tylko domyślać, że chodzi tutaj o aktywność wodną. I nie bardzo rozumiem, jak te dane przedstawione w tabeli mają się do oceny przeżywalności, którą to liczy się na podstawie liczby komórek przed i po suszeniu (jak wynika z przedstawionego wzoru), a nie na podstawie aktywności wodnej.

Moje wątpliwości budzi też interpretacja wyników badań biologicznych dotyczących wpływu preparatów zawierających mikroorganizmy na wschody i początkowy wzrost roślin. W przypadku kukurydzy i soi Doktorantka stwierdza, że badane szczepy spowodowały większy wzrost roślin oraz większą zawartość chlorofilu, natomiast nie wynika to z danych i analiz statystycznych przedstawionych w tabelach wynikowych. Tylko w przypadku doświadczeń na buraku cukrowym widać statystycznie istotne różnice wysokości i masy siewek.

Rozprawę zamyka rozdział **Wnioski**, który obejmuje 8 głównych punktów. Moje zastrzeżenia budzi ich treść, ponieważ część z nich ma charakter raczej podsumowania otrzymanych wyników niż wyciągniętych z nich wniosków, więc lepiej byłoby nazwać ten rozdział „Podsumowanie i wnioski”. Dobór piśmiennictwa jest właściwy, mgr inż. A.J.

Kowalska cytuje 271 pozycji literaturowych, wiele z nich to najnowsze publikacje z renomowanych czasopism naukowych.

Podczas lektury publikacji nasunęły mi się pewne pytania, na które chętnie uzyskałabym odpowiedź Doktorantki podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej:

1. Dlaczego przy metodzie posiewu wgłębnego i metodzie posiewu powierzchniowego występuje różnica w zakresie optymalnej liczby kolonii na płytkach na których bakterie były zliczane? Przy metodzie posiewu wgłębnego było to 30 – 300 kolonii a przy metodzie posiewu powierzchniowego 15 - 150 kolonii.
2. W toku badań Doktorantka stwierdziła, że spośród testowanych nośników stałych, szczep *Bacillus pumilus* B182 największą przeżywalność ma na nawozie Super Start, natomiast szczep *Bacillus amyloliquefaciens* 8/6 wykazuje zarówno na nawozach Super Start jak i Suprofos 25 Plus. Chciałam się dowiedzieć, jaka jest opinia Doktorantki, co może być przyczyną.
3. W dyskusji Doktorantka wspomina, że stwierdzona w czasie jej badań niska przeżywalność komórek w formulacjach poddanych suszeniu pokrywa się z wynikami innych badaczy. W związku z tym moje pytanie, skoro literatura mówi, że suszenie wiąże się z niską przeżywalnością komórek bakteryjnych, dlaczego ten wątek w ogóle był podejmowany w pracy?

Strona językowa i edytorska pracy ogólnie nie budzi zastrzeżeń, chociaż w tego typu i w tak obszernym opracowaniu nie sposób uniknąć pewnych drobnych błędów (przedstawionych poniżej), które nie umniejszają wartości pracy.

- W rozdziale 1.1 występuje stwierdzenie, że ryzosfera jest kolonizowana przez szereg organizmów prokariotycznych do których zaliczono wirusy. Wirusy nie są ani organizmami ani nie należą do prokariotów.
- Rozdział 1.2. powinien mieć polski tytuł, a nie angielski
- Tabela 2 – biopestycydy to przede wszystkim środki ochrony roślin.
- Strona 61 – literówka - powinno być stąd a nie stad.
- Zdania nie powinny się zaczynać od liczby zapisanej cyframi.
- Na stronie 129 nazwy gatunkowe *Rhizobium nepotum* i *Rhizobium radiobacter* są nieprawidłowe, ponieważ gatunki te kilka lat temu zostały przeklasyfikowane do rodzaju *Agrobacterium* i powinny nazywać się *Agrobacterium nepotum* i *Agrobacterium radiobacter*.

- Słowo „uzdolnienia” w stosunku do bakterii jest niewłaściwym sformułowaniem. Bakterie mogą mieć zdolności, ale nie uzdolnienia.
- Podpisy pod wykresami i rysunkami oraz tytuły tabel powinny być samowyjaśniające. Doktorantka powinna, oprócz nazwy numeru szczepu, podać zawsze jego nazwę gatunkową.
- W tabelach numer 80, 81 brak objaśnień skrótów w tytułach kolumn.

Ocena końcowa

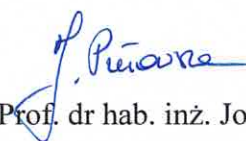
Podsumowując, przedstawioną do recenzji pracę oceniam bardzo dobrze. Uważam, że rozprawa doktorska mgr inż. Aleksandry J. Kowalskiej stanowi dobrze zaplanowaną i zrealizowaną pracę badawczą. Tematyka badawcza jest aktualna i odpowiada na potrzeby rolnictwa i ogrodnictwa. Na podkreślenie zasługuje wieloaspektowość pracy i jej konstrukcja, która od badań podstawowych prowadzi niemalże do produktu końcowego wraz z analizą techniczno-ekonomicznych aspektów produkcji preparatu. Doktorantka w czasie swojej pracy używała bardzo zróżnicowanych technik zarówno mikrobiologicznych jak i analiz z zastosowaniem chromatografii, cytometrii przepływowej, badań nad wpływem mikroorganizmów na wzrost wybranych gatunków roślin, optymalizowała warunki hodowli mikroorganizmów w skali przemysłowej i skład ich formulacji. Wieloaspektowość pracy wymagała od Doktorantki sporego zaangażowania i nabycia kolejnych nowych umiejętności.

Konkludując, uważam, że przedstawiona do oceny praca odpowiada warunkom stawianym rozprawom doktorskim. Wnoszę zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr inż. Aleksandry J. Kowalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej

Biorąc pod uwagę:

- charakter prac obejmujący zarówno badania podstawowe jak i aplikacyjne;
 - obszerny zakres badań;
 - potencjał wdrożeniowy wyników i ich nowatorski charakter,
- wniosuję o wyróżnienie rozprawy, a jej Autorkę stosowną nagrodą.


Prof. dr hab. inż. Joanna Puławska