



INSTYTUT GENETYKI ROŚLIN
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań
Tel. centrala: 61 6550200, sekretariat: 61 6550255 E-mail: office@igr.poznan.pl
www.igr.poznan.pl
NIP: 7811621455 REGON: 000326204 BDO: 000017736

dr hab. Lidia Błaszczyk, prof. IGR PAN
Zakład Mikrobiomiki Roślin
Instytut Genetyki Roślin
Polskiej Akademii Nauk
ul. Strzeszyńska 34
60-479 Poznań

Poznań, dnia 9 stycznia 2023 roku

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **Pani 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",
wykonanej pod kierunkiem **prof. UPP dr. hab. Wojciecha Białasa**
oraz **dr Katarzyny Góralskiej**

Podstawą formalną niniejszej recenzji jest pismo Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Pana prof. dr. hab. Andrzeja Bleharczuka, z dnia 4 listopada 2022 roku (nr RNDRIO-05/4000/2022), w którym to zostałam poinformowana o powierzeniu mi funkcji recenzenta ww. rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Aleksandry Joanny Kowalskiej.

CHARAKTERYSTYKA TEMATYKI BADAWCZEJ

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani 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", została wykonana 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 oraz dr Katarzyny Góralskiej w ramach II edycji programu „Doktorat wdrożeniowy”, realizowanego w latach 2018-2022. Tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy opracowania metodyki otrzymywania biopreparatów na bazie pożytecznych dla roślin uprawnych mikroorganizmów, o zdolnościach do stymulacji wzrostu i rozwoju roślin i potencjale antagonistycznym względem ważnych ich patogenów. Z uwagi na prognozowany wzrost liczby ludności, a przez to, wzrost zapotrzebowania na zdrową i bezpieczną żywność, przy zachowaniu dbałości o środowisko i ograniczeniu chemizacji rolnictwa, dostarczenie nowoczesnych, ekologicznych rozwiązań dla zarządzania uprawami jest niezwykle istotnym i aktualnym tematem. Doktorantka za cel pracy przyjęła pozyskanie ze środowiska bakterii o korzystnych dla roślin właściwościach, zoptymalizowanie metod ich hodowli w skali przemysłowej oraz zaproponowanie różnych formułacji biopreparatów zawierających scharakteryzowany komponent mikrobiologiczny. **Uważam, iż zagadnienie badawcze podjęte w rozprawie doktorskiej przez Panią mgr inż. Aleksandrę Joannę Kowalską doskonale wpisuje się w dziedzinę nauk rolniczych, dyscyplinę rolnictwo i ogrodnictwo. Stwierdzam ponadto, iż zaplanowane przez**

Doktorantkę badania mają wyraźny aspekt praktyczny, odpowiadający pracy doktorskiej o charakterze wdrożeniowym.

OCENA FORMALNA

Rozprawa doktorska ma formę monografii o typowym dla tego typu prac układzie. Oprócz strony tytułowej oraz informacji o finansowaniu badań zawiera w kolejności: spis treści, wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzenie, cel pracy, materiały, metody, wyniki i dyskusję, wnioski, spis tabel, spis rycin, załączniki, spis literatury. Rozdział „Wprowadzenie” mieści się na 58 stronach i obejmuje przegląd literatury z zakresu definiowania czym jest ryzosfera oraz Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), na temat mechanizmów działania tych bakterii, rozkładu biomasy lignocelulozowej, biopreparatów i technicznych aspektów ich formułowania oraz stosowanych nośników, substancji ochronnych i adiuwantów, rodzajów formulacji stałych i płynnych, a także sposobów kapsułkowania mikroorganizmów. Rozdział „Materiały” przedstawiono na 15 stronach, a „Metody” na 40 stronach. Rozdział „Wyniki i dyskusja” obejmuje 130 stron. Całość pracy zawiera 350 stron. W monografii zamieszczono 100 tabel, 89 rycin, 7 załączników mających formę tabel oraz 271 pozycji literaturowych. Praca pod względem językowym jest napisana poprawnie. Nie dostrzega się wyraźnych błędów gramatycznych, stylistycznych, leksykalnych, jak również błędów zapisu, co nadaje tekstowi charakter odpowiedni pracom badawczym, właściwy rozprawom doktorskim.

Na podstawie przedstawionej dokumentacji stwierdzam, iż przyjęta i zaprezentowana forma dysertacji jest kompletna, uporządkowana i czytelna, a zatem spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w myśl Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668, z późn. zm.).

OCENA MERYTORYCZNA

Jak wspomniano powyżej, tematyka badawcza podjęta przez Panią mgr inż. Aleksandrę Joannę Kowalską w ramach pracy doktorskiej jest niezwykle aktualna i ważna z perspektywy kilku dziedzin życia, głównie związanych z rolnictwem i bezpieczeństwem żywnościowym, przemysłem, ochroną środowiska i ekologią, a co najważniejsze, zdrowiem i szeroko rozumianym dobrostanem człowieka. Tematyka ocenianej dysertacji wpisuje się w europejskie i światowe trendy nowoczesnego rolnictwa i strategię zarządzania uprawami, w tym zarządzania chorobami roślin uprawnych/użytkowych, które koncentrują się na ekologicznych, bezpiecznych dla środowiska i człowieka rozwiązaniach, a wśród których istotną uwagę zajmują biopreparaty oparte na pożytecznych, korzystnych dla wzrostu i rozwoju roślin mikroorganizmach, zdolnych do ograniczania chorób roślin uprawnych, wywoływanych przez niekorzystne warunki środowiskowe, czy patogeny. Doktorantka w pracy zdefiniowała bardzo złożony cel, który obejmował: izolację mikroorganizmów środowiskowych oraz stworzenie banku izolatów możliwych do wykorzystania przy projektowaniu biopreparatów; charakterystykę izolatów pod kątem ich zdolności do solubilizacji wybranych pierwiastków z gleby, produkcji fitohormonów oraz asymilacji azotu atmosferycznego; optymalizację warunków hodowli jak również ich weryfikację podczas badań związanych z powiększaniem skali procesu hodowli bioreaktorowych; opracowanie formulacji płynnych oraz na nośnikach stałych zawierających wyselekcjonowane drobnoustroje; charakterystykę właściwości wybranych preparatów w badaniach polowych; techniczno-ekonomiczną analizę uwarunkowań produkcji komponentów mikrobiologicznych wchodzących w skład biopreparatów. Realizacja tego celu była zatem wieloetapowa, wymagała zastosowania licznych metod badawczych, zarówno z zakresu mikrobiologii, biologii molekularnej, bioinformatyki, chemii, biochemii, biotechnologii, fizjologii roślin, matematyki, statystyki i ekonomii oraz znajomości obsługi szeregu urządzeń laboratoryjnych oraz aparatury stosowanej w skali pół-/przemysłowej. Efektem prac Pani mgr inż. Aleksandry Joanny Kowalskiej było pozyskanie z ryzosfery i korzeni roślin uprawnych, a także gleby i różnych form materii organicznej (liście, słoma, ściernisko, odpady zielonki) zebranych ze środowiska rolniczego/sadów, 400 szczepów bakterii. Doktorantka dokonała selektywnej izolacji mikroorganizmów w kierunku bakterii z

rodzaju *Bacillus*, *Azotobacter* i *Azospirillum*. Ponadto, podjęła próbę uzyskania bakterii zasiedlających endosferę korzeni wybranych roślin uprawnych i bakterii celulólicywnych. Z uzyskanego i skolekcjonowanego zestawu 400 szczepów bakterii, do dalszych badań wytypowała 80 szczepów. Szczepy te scharakteryzowała pod kątem ich zdolności do solubilizacji nierozpuszczalnych form fosforu, wapnia, cynku, potasu i krzemu, a w konsekwencji wyselekcjonowała grupę bakterii o najwyższym badanym potencjale. W wyniku przeprowadzonych badań przesiewowych Doktorantka oszacowała, że spośród 75 testowanych szczepów: 42 (56%) szczepy posiadały zdolność do solubilizacji Ca oraz P; 57 (76%) szczepów posiadało zdolność do solubilizacji Zn; 29 (38,7%) szczepów posiadało zdolność do solubilizacji K; 35 szczepów (46,7 %) posiadało zdolność do solubilizacji Si. Ostatecznie, szczepy o najwyższym, udokumentowanym potencjale do solubilizacji ww. makroelementów poddała szczegółowej analizie ilościowej. W wyniku realizacji pracy doktorskiej Pani mgr inż. Aleksandra Joanna Kowalska dokonała także oceny zdolności części wyizolowanych szczepów bakterii do wiązania azotu atmosferycznego i stwierdziła aktywność nitrogenazy u pięciu szczepów z rodzaju *Azotobacter*. Ponadto, wykazała potencjał 47 szczepów (spośród 80 testowanych - 58,8 %) do syntezy kwasu indoliloctowego (IAA) w teście jakościowym, na podłożu z dodatkiem tryptofanu jako prekursora. Wynik ten zweryfikowała na podstawie analizy ilościowej. Doktorantka odnotowała także zdolność 33 szczepów (spośród 80 testowanych - 41,3 %) do produkcji kwasu salicylowego. Na podstawie testu jakościowego wykazała też aktywność deaminazy ACC u 22 (spośród 80 testowanych – 27,5%) szczepów i zweryfikowała wynik w analizie ilościowej. Część wyizolowanych bakterii została scharakteryzowana pod kątem ich zdolności do rozkładu lignin i celulozy. Ostatecznie na podstawie biochemicznych badań przesiewowych Doktorantka wyselekcjonowała 45 szczepów bakterii. W celu identyfikacji gatunkowej tych szczepów, Doktorantka przeprowadziła analizę sekwencji genu 16S rRNA u części izolatów oraz analizę techniką MALDI-TOF. Wykazała, iż wyselekcjonowane szczepy reprezentują następujące rodzaje: *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Lelliottia*, *Xanthomonas*, *Rahnella* i *Burkholderia*. W związku z tym, iż część zidentyfikowanych szczepów bakterii zaklasyfikowano według kolekcji DSMZ oraz ATCC do 2 grupy zagrożenia biologicznego, izolaty te wykluczono z dalszych prac. W wyniku realizacji pracy doktorskiej, spośród ośmiu testowanych podłoży płynnych, Pani mgr inż. Aleksandra Joanna Kowalska wytypowała 3 podłoża właściwe do namnożenia biomasy i uzyskania form przetrwalnikowych bakterii z rodzaju *Bacillus*, na poziomie odpowiednim do badań formulacyjnych w skali laboratoryjnej. Doktorantka w badaniach tych uwzględniła także czas trwania hodowli. W przypadku bakterii z rodzaju *Bacillus* i *Pseudomonas*, Doktorantka zoptymalizowała także warunki hodowli na podłożach stałych w aspekcie pH i temperatury. W celu uzyskania odpowiedniej ilości biomasy, Pani mgr inż. Aleksandra Joanna Kowalska opracowała specyficzne dla poszczególnych szczepów bakterii z gatunku *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Paenibacillus polymyxa* oraz dla szczepów z rodzaju *Pseudomonas* warunki hodowli – typ hodowli, skład pożywki, w tym źródła węgla, pH, temperaturę inkubacji, czas trwania hodowli. Dla dwóch wybranych szczepów bakterii z gatunku *Pseudomonas koreensis* oraz *Pseudomonas congelans*, które wykazały bardzo wysoką zdolność do solubilizacji fosforu, wyznaczyła (dla szczepów pojedynczo jak i w konsorcjum) kinetykę udostępniania fosforu w hodowlach bioreaktorowych bez regulacji pH i udokumentowała, że mechanizmem odpowiedzialnym za solubilizację jest produkcja kwasów organicznych. W przypadku szczepów z gatunku *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *P. polymyxa*, *P. koreensis* oraz *P. congelans* Doktorantka podjęła się niezwykle trudnego zadania jakim było przeskalowanie hodowli laboratoryjnej do przemysłowej, prowadzonej w bioreaktorach produkcyjnych. Do oceny posłużyły Doktorantce takie parametry jak: liczebność komórek (wegetatywnych, przetrwalnikowych), gęstość optyczna, sucha masa komórek, a w przypadku gatunków *Pseudomonas* dodatkowo aktywność metaboliczna i żywotność komórek, oznaczane za pomocą cytometru przepływowego. Na podstawie przeprowadzonych prac, Pani mgr inż. Aleksandra Joanna Kowalskiej udało się z powodzeniem zweryfikować opracowane na etapie laboratoryjnym protokoły uzyskiwania biomasy komórkowej dla wszystkich badanych

szczepów i przeskalać je do poziomu produkcyjnego. Kolejnym wynikiem pracy było otrzymanie stabilnych formacji bakterii, warunkujących ich przeżywalność w trakcie przechowywania. W przypadku szczepów bakterii z gatunku *B. amyloliquefaciens* oraz *B. pumilus* Doktorantka wykonała formacje na bazie granulatów nawozowych, przy czym biomasę komórkową wymienionych szczepów, przed naniesieniem na nawóz, zawieszała w odpowiednim nośniku płynnym. W przypadku bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, Doktorantka dokonała oceny przeżywalności badanych mikroorganizmów na nośnikach stałych, typu: ziemia okrzemkowa, mączka wapienna, bentonit, kaolin i magnezyt prażony oraz granulaty nawozowe, których biomasa była zawieszona w pojedynczym nośniku płynnym i których formacje utrwałała/nie utrwałała metodą suszenia fluidyzacyjnego lub liofilizacji. Dla szczepów *Pseudomonas* nie udało się jednak opracować formacji stałej, która zapewniłaby wysoką przeżywalność komórek w trakcie przechowywania. Stąd Doktorantka podjęła się dla bakterii z rodzaju *Pseudomonas* opracować preparaty w formie płynnej. Skuteczność opracowanych granulatów zawierających bakterie z rodzaju *Bacillus* Pani mgr inż. Aleksandra Joanna Kowalska zweryfikowała na podstawie oceny wpływu ich nawożenia na wzrost kukurydzy, soi oraz buraka cukrowego. Doktorantka udokumentowała pozytywny wpływ nawożenia granulatami na tempo kiełkowania i dalszy wzrost roślin kukurydzy oraz zawartość chlorofilu SPAD, przy czym efekt ten zależał od dawki nawozu. W przypadku soi odnotowała jedynie wpływ nawożenia biopreparatami szczepów z rodzaju *Bacillus* na wzrost roślin, a w przypadku buraka cukrowego zarówno na tempo kiełkowania i dalszy wzrost roślin, przy czym, podobnie jak u kukurydzy, efekt ten zależał od dawki nawozu, a także od szczepu/gatunku bakterii. Doktorantka wykazała także pozytywny wpływ zaprawiania nasion kukurydzy szczepami *Pseudomonas* na stopień odżywienia roślin azotem i zawartość fosforu, magnezu i wapnia w roślinach oraz wzrost ich suchej masy. Efektu takiego nie odnotowała w przypadku roślin pszenicy. Pani mgr inż. Aleksandra Joanna Kowalska wykazała ponadto aktywność antagonistyczną szczepu *P. koreensis* względem patogenicznych szczepów z gatunku *Rhizobium nepotum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium culmorum* oraz *Alternaria alternata*, a szczepu *P. congelans* względem patogenicznych szczepów *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *R. nepotum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* i *F. culmorum*. Doktorantka dokonała szczegółowej analizy techniczno-ekonomicznej procesu produkcji biomasy szczepu *Paenibacillus polymyxa*.

Doktorantka na podstawie uzyskanych wyników sformułowała osiem wniosków głównych, a ponadto sześć wniosków podrzędnych przy wniosku piątym w kolejności oraz pięć wniosków podrzędnych przy wniosku szóstym w kolejności. Za najważniejsze w mojej opinii jest stwierdzenie przez Doktorantkę, że: i) wyizolowane mikroorganizmy wchodzące w skład stworzonego repozytorium szczepów posiadają zróżnicowany potencjał pod kątem solubilizacji fosforu, wapnia, potasu, cynku i krzemu, wiązania azotu atmosferycznego, produkcji IAA i kwasu salicylowego, aktywności deaminazy ACC oraz rozkładu celulozy i ligniny; ii) na przykładzie szczepów z gatunku *P. koreensis* i *P. congelans* wykazano, że mechanizmem odpowiedzialnym za solubilizację fosforu jest przede wszystkim synteza kwasów organicznych; iii) skład podłoża oraz warunki procesu namnażania mają istotny wpływ na liczebność komórek vegetatywnych oraz przetrwalników; iv) skład badanych formacji oraz sposób ich przygotowania ma istotny wpływ zarówno na kinetykę zmian liczebności komórek w preparacie jak i na jej końcową wartość; v) suszenie formacji stałych zawierających w swoim składzie szczepy nieposiadające zdolności do tworzenia przetrwalników powoduje istotny spadek liczebności komórek; vi) w formacjach stałych, produkowanych z pominięciem procesu utrwalania za pomocą suszenia, wysoka aktywność wodna sprzyjała intensywnemu rozwojowi pleśni; vii) formacje zawierające w swoim składzie szczepy z rodzaju *Bacillus* mają pozytywny wpływ na wybrane parametry charakteryzujące wzrost takich roślin jak soja, kukurydza i burak cukrowy; viii) bakterie z rodzaju *Pseudomonas* mimo posiadanych zdolności do solubilizacji fosforu, nie wpływają istotnie na poprawę wzrostu w uprawach kukurydzy i pszenicy; ix) szczep *P. koreensis* wykazuje aktywność przeciwbakteryjną względem patogenicznego szczepu z gatunku *R. nepotum* oraz przeciwgrzybiczą względem *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. culmorum* oraz *A. alternata*,

natomiast szczep *P. congelans* wykazuje aktywność przeciwbakteryjną względem patogenicznych szczepów *E. coli*, *S. aureus*, *R. nepotum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* i *F. culmorum*. Tymczasem dwa ostatnie wnioski sformułowane przez Doktorantkę, można uznać za ważne efekty końcowe, albowiem opracowana w ramach doktoratu technologia namnażania szczepu z gatunku *P. polymyxa*, została z powodzeniem wdrożona w przedsiębiorstwie i pozwoliła na uzyskanie takiej liczebności przetrwalników, która umożliwi wytworzenie koncentratu komórek i w konsekwencji wpłynie na obniżenie kosztów jednostkowych produktu, co potwierdziła analiza techniczno-ekonomiczna procesu.

Pytania, uwagi, komentarze oraz uwagi edytorskie:

I. Wprowadzenie

1. Str. 19, wers 9 – stwierdzenie: „Nadmierne i masowe stosowanie chemikaliów spowodowało skażenie żywności, odporność chwastów na herbicydy oraz negatywne skutki środowiskowe, które łącznie mają znaczący wpływ na zdrowie człowieka” wydaje się być zbyt generalizujące. Czy to oznacza, że cała żywność jest skażona i wszystkie chwasty są odporne na herbicydy? Czy ten „znaczący wpływ na zdrowie człowieka” jest negatywny, czy pozytywny? Proszę o komentarz.
2. Str. 20, wers 6 – w zdaniu: „Składają się na nią trzy oddzielne, ale wzajemnie oddziałujące składowe: ryzosfera (gleba), ryzoplan i korzeń (Ryc. 1).” pojęcie „ryzosfera” powinno być zastąpione pojęciem „gleba ryzosferowa”.
3. Str. 21, wers 17 – zdanie: „Interakcje między tymi drobnoustrojami a roślinami można podzielić na trzy kategorie: neutralne, negatywne lub pozytywne (Whipps, 2001).” powinno raczej brzmieć: „Wpływ tych drobnoustrojów na rośliny może być neutralny, negatywny lub pozytywny (Whipps, 2001).”
4. Str. 21, wers 19 – proszę wyjaśnić, co w zdaniu: „Większość ryzobakterii związanych z roślinami to komensale, w których bakterie nawiązują nieszkodliwą interakcję niemającą żadnego widocznego wpływu na wzrost i fizjologię rośliny.” oznacza zwrot „nieszkodliwą interakcję”.
5. Tabela 1 – proszę uzasadnić dlaczego mechanizm indukowanej odporności systemicznej klasyfikuje się jako mechanizm pośredni działania bakterii zaliczanych do tzw. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)?
6. Str. 22, wers 14 – proszę wyjaśnić, co w zdaniu: „Oprócz klasyfikacji funkcjonalnych, PGPR można dalej pogrupować w odniesieniu do przedziału roślinnego, który zajmują na pozakomórkowe, wolnożyjące ryzobakterie promujące wzrost roślin (ePGPR, ang. *extracellular Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) i symbiotyczne, wewnątrzkomórkowe ryzobakterie promujące wzrost roślin (iPGPR, ang. *intracellular Plant Growth Promoting Rhizobacteria*).” oznacza zwrot „przedział roślinny”.
7. Str. 22, wers 21 – w zdaniu: „Rodzaje bakterii włączone jako ePGPR to *Azotobacter*, *Serratia*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* i *Burkholderia*.” należałoby użyć np. „zaliczane” lub „klasyfikowane” zamiast „włączone”.
8. Str. 23, wers 7 – nie jest poprawne użycie zwrotu: „*Rhizobium*, symbiotyczna bakteria mutualistyczna”, ponieważ *Rhizobium* to rodzaj, który nie jest reprezentowany przez jedną bakterię.
9. Str. 26, wers 13 – w zdaniu: „Wyróżnia się dwa rodzaje mikroorganizmów wiążących azot z atmosfery: symbiotyczne i niesymbiotyczne.” zwrot „dwa rodzaje” proponowałabym zastąpić „dwie grupy”.
10. Str. 26, wers 16 – w zdaniu: „Bakterie niesymbiotyczne są to wolnożyjące mikroorganizmy, które fizycznie nie oddziałują z korzeniami, lecz znajdują się w ich pobliżu, dzięki czemu związany przez nie azot może być łatwo pobierany przez rośliny.” nie zgodziłabym się ze stwierdzeniem, że ww. bakterie fizycznie nie oddziałują z korzeniami roślin, ponieważ brak tworzenia specyficznych struktur na powierzchni korzeni roślin nie oznacza braku fizycznego kontaktu z nimi.

11. Str. 29, wers 7 – Doktorantka podaje nazwy rodzajowe grzybów wytwarzających fitazę, choć rozdział dotyczy bakterii.
12. Str. 32, wers 22 – Doktorantka pisze: „Doniesiono, że produkcja różnych polimerów pozakomórkowych, głównie białek i polisacharydów, także może prowadzić do uwalniania K z minerałów.”, ale nie podaje referencji. Danych tych często brakuje w rozdziale, lub podawane są dopiero na końcu całego akapitu, co czytającemu utrudnia stwierdzenie, czy przedstawiane dane są oparte o dotychczasową literaturę, czy opinię własną Doktorantki.
13. Str. 36, wers 32 – proszę o wyjaśnienie co w zdaniu: „Zaobserwowano, że rośliny z niedoborem IAA utraciły zdolność do unikania cienia sąsiednich roślin i w konsekwencji wykazywały zahamowany wzrost w porównaniu z normalnymi roślinami.” oznacza stwierdzenie „rośliny z niedoborem IAA utraciły zdolność do unikania cienia sąsiednich roślin” oraz pojęcie „normalne” rośliny.
14. Str. 37, wers 9 – proszę o wyjaśnienie co Doktorantka miała na myśli używając w zdaniu: „Wśród genów o zróżnicowanej ekspresji są te związane z wirulencją, reakcjami na stres, metabolizmem, adaptacją bakterii i syntezą aminokwasów.” pojęcia: „geny o zróżnicowanej ekspresji”.
15. Str. 39, wers 20 – w zdaniu: „IAA napędza również różnicowanie korzeni przybyszowych z łodygi, ponieważ auksyny indukują tkanki łodygi do ponownego różnicowania się jako tkanka korzeniowa (Goswami i in., 2016).” słowo „napędza” jest w moim odczuciu błędem językowym.
16. Str. 40, wers 8 – degradację jakiego produktu Doktorantka miała na myśli pisząc: „W owocach i warzywach powoduje dojrzewanie i degradację produktu.”? - proszę o wyjaśnienie.
17. W podrozdziale „1.3.9. Produkcja kwasu salicylowego” warto byłoby przybliżyć mechanizm nabytej odporności systemicznej SAR.
18. Str. 42, wers 25 – “Systemic acquired resistance” - w języku polskim stosujemy: „nabyta odporności systemiczna”, nie „systemowa odporność nabyta”.
19. Str. 42, wers 29 – „HR” (ang. hypersensitive response) – w j. polskim stosujemy „reakcja nadwrażliwości, nie „odpowiedź nadwrażliwości”.
20. Str. 47, wers 32 – proszę o wyjaśnienie znaczenia zwrotu „źródła rybosomalne i nierybosomalne” w zdaniu: „Bakterie z rodzaju *Bacillus* produkują szeroką gamę antybiotyków przeciwgrzybiczych i przeciwbakteryjnych, pochodzących ze źródeł rybosomalnych (np. subtylizyna A, sublancyna) i nierybosomalnych (bacylizyna, mykobacylina, dyficydyna), a także antybiotyki lipopeptydowe, takie jak surfaktyna, ituryny i bacylomycyna (Gouda i in., 2018).”.
21. Str. 48, wers 11 – błędy stylistyczne i leksykalne: „Gdyby HCN wytwarzany przez te bakterie był jedynym mechanizmem biokontroli, jego niski poziom nie byłby szczególnie skuteczny w zwalczaniu większości fitopatogenów grzybowych. Jednak często jest tak, że PGPR, które mogą wytwarzać HCN, syntetyzują również niektóre antybiotyki lub enzymy degradujące ścianę komórkową patogenów. Ponadto zaobserwowano, że niski poziom HCN syntetyzowany przez bakterie poprawia skuteczność działania przeciwgrzybiczego, zapewniając tym samym, że grzyby nie rozwiną oporności na dany środek przeciwgrzybiczy.”
22. W podrozdziale „1.3.15. Indukowanie odporności systemicznej” warto byłoby szerzej opisać mechanizm ISR.
23. Rozdział „1.4.” – piszemy zwyczajowo: „biomasa lignocelulozowa”, nie „ligninocelulozowa”
24. Rozdział „1.5.4.” – proszę o komentarz, czy bionawozy, biostymulatory, biopestycydy są preparatami mikrobiologicznymi?
25. Rozdziały 1.10 i 1.11 Doktorantka podzieliła na liczne, często bardzo krótkie podrozdziały - proponowałabym unikanie stosowania kilkuzdaniowych podrozdziałów.

II. Cel pracy

Pani Mgr inż. Aleksandra J. Kowalska zaproponowała bardzo złożony cel badawczy. Proponowałabym w takiej sytuacji wyznaczenie głównego, nadrzędnego celu badawczego i

kilka celów podrzędnych. Ponadto - pomimo iż jest to doktorat wdrożeniowy - warto byłoby postawić hipotezę badawczą.

III. Materiały

1. Jakie kryterium zastosowano przy wyborze 80 izolatów z uzyskanej kolekcji 400 szczepów bakterii?
2. Brak informacji o producentach odczynników, składników podłoża mikrobiologicznych itp. Dane te przedstawiono jedynie w przypadku podłoża Muller-Hinton i Potato Dextrose Agar.

IV. Metody

1. Doktorantka izolowała grzyby endofityczne z korzeni roślin. Warto mieć na uwadze fakt, że homogenizacja korzeni wykorzystanych do izolacji bakterii z rodzaju *Bacillus* również mogła przyczynić się do „uwolnienia” z wewnętrznych tkanek roślinnych bakterii endofitycznych.
2. Doktorantka bardzo szczegółowo i w sposób uporządkowany i logiczny przedstawiła stosowane w pracy metody badawcze. W przypadku opisu badań przesiewowych, np. dotyczących oceny zdolności mikroorganizmów do solubilizacji minerałów, część prowadzonych prac była jednak podobna. Tę część warto by było opisać wspólnie dla wszystkich wariantów, a tylko wyszczególnić te etapy, których metodyka się różniła, np. metodę oznaczenia ilościowego.
3. Rozdział „4.9.8. Synteza deaminazy ACC”, podrozdział „4.9.8.1. Badanie skринingowe” – proszę o uzupełnienie metody identyfikacji szczepów o zdolność do syntezy aktywnej formy deaminazy ACC na stałym podłożu minimalnym DF z ACC.
4. Doktorantka dokonała identyfikacji wyselekcjonowanych mikroorganizmów na podstawie analizy sekwencji fragmentu genu 16S rRNA. Proszę wyjaśnić, dlaczego analizę sekwencyjną z wykorzystaniem markera filogenetycznego przeprowadzono tylko dla części izolatów, a nie całego, wyselekcjonowanego na podstawie badań przesiewowych zestawu szczepów? Czy Doktorantka rozważała analizę sekwencji i identyfikację gatunkową na podstawie innych markerów filogenetycznych, które pozwoliłyby na weryfikację danych sekwencyjnych dla 16S.
5. W rozdziale 4.10.1., przy opisie reakcji PCR i elektroforezy Doktorantka nie podała nazw i danych producenta stosowanych odczynników, jak również referencji lub sekwencji stosowanych starterów i nazwy producenta komercyjnego zestawu do izolacji DNA z żeli agarozowych.
6. Str. 109, wers 23 – w zdaniu: „W tym celu wycięto kawałek żelu zawierający właściwy produkt reakcji PCR, zawieszono w 0,4 ml R7S i inkubowano w 50°C do całkowitego rozpuszczenia agarozы.” Doktorantka użyła stwierdzenia: „wycięto kawałek żelu zawierający właściwy produkt reakcji PCR”, nie precyzuje jednak czym jest „kawałek żelu”, jak również „właściwy produkt”.
7. W rozdziale 4.10.1., przy opisie analizy porównawczej uzyskanych sekwencji Doktorantka nie uściśla jaką formą wyników dysponowała, czy surowymi danymi chromatograficznymi, czy sekwencjami w formacie FASTA. W tym miejscu warto również podkreślić, że tzw. BLAST, który Doktorantka wykorzystywała przy identyfikacji uzyskanych sekwencji nukleotydowych jest algorytmem i nosi nazwę Standard Nucleotide BLAST (blastn, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).
8. Rozdział „4.10.2. Identyfikacja mikroorganizmów przy użyciu spektrometru mas typu MALDI-TOF” – brak dostatecznych danych na temat przygotowania prób (materiału bakteryjnego) do analiz i procedury identyfikacji / referencji.
9. Nazwa rozdziału „4.13. Badania biologiczne” jest zbyt ogólna i nie odnosi się ściśle do zawartych pod tym tytułem zagadnień związanych z badaniem wpływu wyselekcjonowanych mikroorganizmów i ich formułacji na wybrane parametry morfofizjologiczne i biochemiczne roślin uprawnych.
10. Rozdział „4.13. Badania biologiczne” – Doktorantka w rozdziale „2. Cel pracy” podaje, że celem prowadzonych badań jest min. charakterystyka właściwości wybranych preparatów w badaniach polowych. Należałoby jednak uściślić, że stosowane w pracy warunki wzrostu roślin nie są polowe, a raczej modelowe, kontrolowane, co wynika z opisu metodyki.

Doktorantka nie podała też pełnych danych dotyczących innych niż temperatura parametrów uprawy roślin. Ponadto w doświadczeniu tym Doktorantka zastosowała torf jako podłoże. Czy Doktorantka brała pod uwagę, że ten rodzaj podłoża jest bardzo bogaty w mikroorganizmy i czy analizując wybrane parametry roślin nie obawiała się dodatkowego wpływu tych mikroorganizmów na obserwowane cechy? Czy aby przybliżyć warunki polowe, nie byłoby korzystniej zastosować glebę z pola, na którym uprawiane są badane rośliny? Proszę o komentarz.

11. Rozdział „4.13.2. Pomiar chlorofilu SPAD” – proszę o wyjaśnienie lub uszczegółowienie następujących sformułowań: „Pozwala to podjąć zmiany związane z nawożeniem i tym samym ograniczyć straty plonów” oraz „Urządzenie posiada specjalny klips, który zakłada się na liść i następuje automatyczny pomiar chlorofilu w jednostkach SPAD.”
12. Rozdział „4.13.3. Oznaczanie zawartości makroelementów” – proszę o uszczegółowienie sformułowania: „Tak przygotowane próbki zmineralizowano w piecu mikrofalowym ETHOS UP (MILESTONE) z wykorzystaniem odpowiedniego programu precyzyjnie określającego warunki mineralizacji...” w kontekście „odpowiedni program”.
13. Rozdział „4.14. Aktywność antymikrobiologiczna” – proszę o wyjaśnienie, jakie kryteria stosowano przy wyborze gatunków i szczepów mikroorganizmów patogennych stosowanych na tym etapie badań.

V. Wyniki i dyskusja

1. W rozdziale „5.2.4. Solubilizacja krzemu” Doktorantka pisze: „Krzem wspomaga wzrost, rozwój i plonowanie wielu roślin oraz zmniejsza częstość występowania wielu chorób grzybiczych, wzmacniając ściany komórkowe.” – stwierdzenie to, w szczególności fragment: „wzmacniając ściany komórkowe” jest zbyt uogólniające jak na formę pracy jaką jest praca naukowa. Podobnie w zdaniu „Bakterie solubilizujące krzemiany mogą odegrać rolę rozpuszczając nierozpuszczalne formy krzemianów, zwiększając żyzność gleby i wzmacniając mechanizmy obronne roślin (Naureen i in., 2015).” Doktorantka nie uściśla jaką rolę mogą odegrać bakterie solubilizujące krzemiany.
2. Mikroorganizmy, które wykazały najwyższy potencjał do wiązania azotu atmosferycznego, oszacowany metodą metody Kjeldahla, poddano dalszej analizie na aktywność nitrogenazy, za pomocą metody redukcji acetyleny do etylenu. Czy Doktorantka porównywała obydwie te metody i uzyskane na ich podstawie wyniki? Proszę o komentarz.
3. W rozdziale „5.2.6. Synteza kwasu indoliloctowego” Doktorantka pisze: „Test porównań wielokrotnych Tukey’a wykazał, że nie ma różnic istotnych statystycznie w poziomie IAA między szczepami E35 i WG5.” Brak różnic istotnych statystycznie w poziomie IAA odnotowano także w przypadku innych szczepów, np. E7, A25, E10. Proszę o wyjaśnienie kontekstu.
4. Czy Doktorantka badała korelację pomiędzy wynikami uzyskanymi na podstawie testu płytkowego a analizą ilościową szczepów w aspekcie zdolności do syntezy IAA? Pytanie to dotyczy właściwe wszystkich analiz, które obejmowały zarówno test płytkowy jak i dalszą ocenę ilościową. Proszę o komentarz.
5. Doktorantka analizowała zdolności wybranych mikroorganizmów do rozkładu celulozy. Jak Doktorantka interpretowałaby wyniki uzyskane np. dla szczepów: B8, B182, D4, W3, W5, dla których aktywność celulolityczna wyrażona w jednostkach [D/d] była niższa po 48 godzinach hodowli niż po 24 godzinach?
6. W rozdziale „5.3. Identyfikacja wyselekcjonowanych mikroorganizmów” Doktorantka pisze: „Na podstawie przeprowadzonych badań skringingowych, wytypowano 45 szczepów, które poddano identyfikacji genetycznej przy zastosowaniu techniki, która opiera się o analizę genu kodującego 16S rRNA oraz przy zastosowaniu techniki spektrometrii mas typu MALDI-TOF.”. Zdanie to powinno brzmieć: „... która opiera się o analizę sekwencji fragmentu genu...”. Dalej, Doktorantka pisze: „Część z tych szczepów nie została zidentyfikowana za pomocą metody spektrometrii mas, a dla pozostałych izolatów wyniki identyfikacji były na niskim poziomie prawdopodobieństwa.”. Zdanie to powinno raczej brzmieć: „...na niskim poziomie podobieństwa sekwencji”.

7. Z uwagi na otrzymany brak zgodności wyników metodą sekwencjonowania i MALDI-TOF w przypadku części izolatów warto byłoby rozważyć analizę np. innego markera filogenetycznego. Prawidłowa identyfikacja gatunkowa jest istotna z punktu widzenia przynależności do grup zagrożenia biologicznego i dalszych prac badawczych i wdrożeniowych nad danym mikroorganizmem.
8. W Tabelach nr 60 i 61 podano wyniki wpływu pH podłoża i temperatury hodowli na wzrost wybranych mikroorganizmów. Czy wykonano powtórzenia biologiczne i czy średnica wyrosłej kolonii [mm] przedstawiona w tabelach jest średnią dla powtórzeń biologicznych?
9. Na rycinach 37, 39, 41, 42 przedstawiających zdjęcia preparatów mikroskopowych proponowałabym wskazać komórki wegetatywne i przetrwalnikowe oraz podać skalę.
10. W rozdziale „5.4.4. Powiększanie skali hodowli” Doktorantka pisze: „Najpopularniejszą i najskuteczniejszą metodą pozyskiwania znacznych ilości biomasy są tanie produkty i produkty uboczne.” Proszę o wyjaśnienie co oznacza w tym kontekście sformułowanie „tanie produkty i produkty uboczne”.
11. Czym Doktorantka tłumaczyłaby obserwowany podczas przechowywania formulacji mikroorganizmu na ziemi okrzemkowej bez suszenia wzrost grzybów pleśniowych - oprócz sprzyjających rozwojowi grzybów podwyższonej wilgotności?
12. Czy analizując wpływ opracowanych formulacji mikroorganizmów na rośliny uprawne Doktorantka rozważała ocenę stopnia zasiedlenia ryzosfery i korzeni roślin przez wprowadzone mikroorganizmy?
13. Czy analizując właściwości antagonistyczne wyselekcjonowanych mikroorganizmów na patogeny roślin uprawnych Doktorantka rozważała przeprowadzenie doświadczeń modelowych w układzie biopreparat-roślina-patogen?

VI. Wnioski

Doktorantka na podstawie przeprowadzonych badań sformułowała osiem wniosków głównych, a ponadto sześć wniosków podrzędnych przy wniosku piątym w kolejności oraz pięć wniosków podrzędnych przy wniosku szóstym w kolejności. Część z tych wniosków ma jednak charakter podsumowania wyników, np. wniosek drugi, wnioski podrzędne wniosku piątego, wniosek szósty i podrzędne, siódmy oraz ósmy.

Pragnę podkreślić, iż wszystkie zamieszczone uwagi i komentarze wskazują raczej na potrzebę dodatkowego wyjaśnienia lub uzupełnienia pewnych zagadnień, czy też rozwinięcia dyskusji nad niektórymi, bardzo interesującymi w moim odczuciu wątkami pracy. Nie umniejszają natomiast wysokiego poziomu badań i wartości uzyskanych wyników.

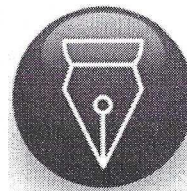
PODSUMOWANIE

Przedstawioną do recenzji pracę doktorską oceniam bardzo wysoko. Uważam, że jest zarówno wartościowym opracowaniem naukowym, wnoszącym nowe, istotne odkrycia pozwalające lepiej poznać charakter bakterii bytujących w glebie, ryzosferze i korzeniach roślin uprawnych/użytkowych, zwłaszcza w kontekście ich funkcjonowania w warunkach kontrolowanych, jak i ważnym opracowaniem technologicznym. Oryginalność niniejszej pracy zawiera się w skolekcjonowaniu nowych, unikalnych i pochodzących z naturalnego środowiska szczepów bakterii, charakterystyce biochemicznej tych szczepów i ich klasyfikacji taksonomicznej. Co najważniejsze, realizacja pracy doktorskiej wpłynęła znacząco na rozwój technologii tworzenia biopreparatów na bazie unikalnych szczepów bakterii o potencjale do biostymulacji wzrostu i rozwoju roślin uprawnych oraz ich ochrony przed chorobami wywoływanymi przez mikroorganizmy patogeniczne. Izolacja ze środowiska, charakterystyka i selekcja szczepów bakterii o pożądanych cechach, optymalizacja metod ich namnażania w skali od laboratoryjnej do produkcyjnej, opracowanie trwałych formulacji tych mikroorganizmów i udokumentowanie ich wpływu na wzrost i rozwój roślin pszenicy, kukurydzy, soi i buraka cukrowego, a ostatecznie wdrożenie opracowanych technologii do przedsiębiorstwa zasługuje na duże uznanie. Realizacja tak wielu etapów badań o różnym charakterze, z pogranicza mikrobiologii, fizjologii roślin, biologii molekularnej, chemii,

biotechnologii, czy ekonomii, wymagała od Doktorantki znajomości wielu narzędzi i metod badawczych, dużej wiedzy teoretycznej, ale przede wszystkim olbrzymiego zaangażowania. Warto podkreślić, iż opracowane w ramach pracy doktorskiej technologie wychodzą naprzeciw krajowemu, europejskiemu, a nawet światowemu zapotrzebowaniu na ekologiczne, bezpieczne dla środowiska i zdrowia człowieka rozwiązania, możliwe do wykorzystania w rolnictwie przy zarządzaniu uprawami. Uważam, iż realizacja pracy doktorskiej i wdrożenie opracowanych metod przez współpracującą w ramach doktoratu firmę może przez wpłynąć znacząco na rozwój firmy i przyczynić się do umocnienia jej pozycji na rynku krajowym i zagranicznym. **W związku z powyższym rozprawę doktorską Pani 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", wykonaną pod kierunkiem prof. UPP dr. hab. Wojciecha Białasa oraz dr Katarzyny Góralskiej oceniam pozytywnie i stwierdzam, że dysertacja spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668, z późn. zm.). Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr. inż. Aleksandry Joanny Kowalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. W związku z tym, iż oceniana praca doktorska stanowi oryginalne i kompleksowe rozwiązanie problemu badawczo-wdrożeniowego, dostarcza wielu cennych wyników naukowych i gotowych rozwiązań technologicznych, wskazuje na doskonałą wiedzę teoretyczną i praktyczną Pani mgr. inż. Aleksandry Joanny Kowalskiej w zakresie dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo oraz umiejętność prowadzenia przez nią złożonej, wieloetapowej pracy badawczej z pogranicza min. mikrobiologii, fizjologii roślin, biotechnologii, biochemii, ekonomii, wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej.**

Poznań, dnia 9 stycznia 2023 r.

dr hab. Lidia Błaszczyk, prof. IGR PAN



Signed by /
Podpisano przez:

Lidia Błaszczyk

Date / Data:
2023-01-09 21:14