

Puławy, dn. 06.10.2021 r.

**dr hab. Anna Gałązka, prof. IUNG-PIB**

**Zakład Mikrobiologii Rolniczej**

## **RECENZJA**

**rozprawy doktorskiej mgr Zyty Waraczewskiej**

**pt. „Wpływ koinokulacji na aktywność mikrobiologiczną gleby, proces diazotrofii i  
plonowanie lubinu białego (*Lupinus Albus* L.)**

Przedłożona do oceny praca doktorska Pani mgr Zyty Waraczewskiej została wykonana w Katedrze Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. Alicji Niewiadomskiej, prof. UPP jako promotora oraz dr inż. Karoliny Ratajczak jako promotora pomocniczego. Recenzję rozprawy doktorskiej Pani mgr Zyty Waraczewskiej przygotowano na prośbę Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo UP w Poznaniu, Pana prof. dr hab. Andrzeja Blecharczyka.

### **1. Uwagi ogólne i znaczenie podjętej tematyki badań**

Na rynku krajowym i zagranicznym obserwuje się wciąż rosnące zainteresowanie biologicznymi metodami zwiększania plonowania i jakości plonów roślin bobowatych, powodowane zarówno zwiększonym zainteresowaniem rolnictwem zrównoważonym i ekologicznym, jak i dostrzeganiem przez producentów rolnych ewidentnych korzyści ekonomicznych wynikających ze stosowania tych rozwiązań. W naszym kraju, a także w całej Europie, w ostatnich latach wzmożono wysiłki zarówno na poziomie nauki i polityki gospodarczo-środowiskowej w celu zwiększenia areału uprawy roślin bobowatych, ze względu na dobrze znaną ważność tych roślin dla środowiska glebowego i gospodarki paszowej. Stąd też w kontekście uprawy roślin bobowatych zasadnym jest wprowadzanie odpowiednio wyselekcjonowanych i rodzimych szczepów bakteryjnych. Problematyka omawianej rozprawy doktorskiej bardzo dobrze wpisuje się w ten trend.

Zastosowanie w uprawie preparatów mikrobiologicznych poprawiających wzrost i plonowanie roślin bobowatych oraz wpływających korzystnie na żyzność i aktywność biologiczną gleby naturalnie zwiększa potencjał biologiczny gleb, w tym ich zasobność w składniki mineralne i materię organiczną. W Polsce uprawia się różne gatunki roślin strączkowych, wśród których największe znaczenie gospodarcze mają groch siewny, soja, łubin i bobik. Rodzime rośliny strączkowe cechują się, co jest ich wadą, dużą zmiennością plonowania, na co wpływ mają czynniki agrotechniczne i siedliskowe, a w szczególności pogodowe.

Udział bakterii w kształtowaniu żyzności i zdrowotności gleby jest powszechnie znany, ponieważ to właśnie mikroorganizmy glebowe odgrywają główną rolę w mineralizacji materii organicznej, udostępnianiu roślinom składników pokarmowych, powstawaniu humusu glebowego, ograniczaniu patogenów i wielu innych. Mikroorganizmy glebowe odgrywają istotną rolę w przemianach wielu pierwiastków w przyrodzie oraz biorą udział także w przemianach fosforu, potasu, siarki i żelaza.

Intensywny rozwój badań mikrobiologicznych na przełomie XX i XXI wieku doprowadził do wyodrębnienia i zidentyfikowania wielu ważnych grup mikroorganizmów glebowych, a także coraz dokładniejszego poznawanie ich biologii, ekologii, fizjologii oraz kluczowej roli w przeprowadzaniu wyżej wymienionych procesów. Na przełomie tych lat rozwijały się również badania nad wykorzystywaniem różnych grup pożytecznych drobnoustrojów w praktyce rolniczej. W efekcie tych badań opracowano i wdrożono do produkcji w różnych krajach liczne biopreparaty, wśród których dominują preparaty wykorzystywane w biologicznej ochronie roślin, czyli preparaty zawierające w swoim składzie mikroorganizmy antagonistyczne lub pasożytnicze w stosunku do patogenów i szkodników roślin, oraz mniej liczne szczepionki stymulujące aktywność biologiczną gleb lub korzystnie oddziałujące na wzrost i plonowanie roślin, np. biopreparaty zawierające mikroorganizmy symbiotyczne (bakterie brodawkowe dla roślin bobowatych). Niniejsza dysertacja opisuje ten właśnie zakres badań oraz akcentuje potrzebę oraz zasadność wdrażania produktów mikrobiologicznych do praktyki rolniczej.

Ponadto wzrastająca świadomość konieczności ograniczania nadmiernej chemizacji rolnictwa spowodowała, że zwiększyło się zainteresowanie naturalnymi środkami produkcji stosowanymi w rolnictwie. Jedną z koncepcji jest wykorzystanie biotechnologicznych cech

i praktycznych właściwości mikroorganizmów. Rynek dla tego typu preparatów stale rośnie ze względu na coraz większe zainteresowanie producentów oraz możliwość stosowania w uprawach gatunków o dużym znaczeniu gospodarczym. Niniejsza praca doktorska wpisuje się także w tzw. Europejską Strategię Bioróżnorodności oraz założenia Europejskiego Zielonego Ładu, który zakłada m.in. ograniczenie o 50% stosowania pestycydów chemicznych i związanego z tym ryzyka, a także ograniczenie o 50% stosowania bardziej niebezpiecznych pestycydów, jak również objęcie co najmniej 25% gruntów rolnych rolnictwem ekologicznym i znaczące podwyższenie poziomu stosowania praktyk agroekologicznych. Doktorantka także zwraca uwagę na ten ważny aspekt zmian, który ma w niedługim czasie nastąpić.

Poznanie i praktyczne wykorzystanie drobnoustrojów ryzosferowych stymulujących wzrost i plonowanie roślin (PGPR) coraz częściej odwołuje się do symultanicznego działania różnych ich grup. Jedną z takich kombinacji jest inokulacja roślin bobowatych bakteriami symbiotycznymi (*Rhizobium*) z endofitami. Stąd też zastosowanie ryzobiów do wspomagania wzrostu roślin bobowatych w koinokulacji z endofitami uwzględniłam za bardzo ciekawy pomysł Doktorantki, z dużym aspektem zastosowania otrzymanych wyników badań w praktyce. W powyższym kontekście problematyka ocenianej pracy doktorskiej **ma znaczenie użyteczne i praktyczne** ze względu na możliwości wdrażania osiągniętych wyników badań do praktyki. Recenzowana rozprawa doktorska opiera się zarówno na laboratoryjnych metodach podstawowych jak i metodykach doświadczalnych z udziałem roślin. Warte podkreślenia jest również to, że w recenzowanej dysertacji jasno i profesjonalnie przedstawiono wyniki badań będące efektem bardzo rzetelnego poprowadzenia doświadczeń w kolejnych stopniach oceny wpływu bakterii z rodzaju *Rhizobium* i wybranych endofitów na wspomaganie wzrostu łubinu białego.

Przedstawiona powyżej problematyka pracy dotyczy istotnych i aktualnych zagadnień związanych z ochroną środowiska glebowego, a w oparciu o uzyskane rezultaty bardzo wysoko oceniam istotność, trafność i aktualność podjętej tematyki badawczej.

## **2. Ocena formalna rozprawy doktorskiej**

Opiniowana rozprawa doktorska ma postać monotematycznej dysertacji liczącej 197 stron, na których znajduje się: 29 rycin, 31 tabel, 12 fotografii oraz 412 pozycji

literaturowych. Składa się ona z klasycznych rozdziałów zgodnych ze schematem prac badawczych.

Rozprawa zbudowana jest z 12 rozdziałów zasadniczych poprzedzonych 4 stronicowym spisem treści. Do poszczególnych rozdziałów należy zaliczyć: „**Wstęp**” jako jednostronicowe wprowadzenie do tematyki badań, „**Przegląd literatury**” czyli syntetyczny opis tematyki badawczej z podziałem na trzy podrozdziały, rozdział „**Problemy badawcze**”, „**Hipotezy badawcze**” oraz „**Cel pracy**”. Kolejnymi rozdziałami są „**Materiały i metody**”, następnie „**Wyniki**”, „**Dyskusja**”, „**Wnioski**” oraz „**Bibliografia**”. Do rozdziałów uzupełniających pracę zaliczam dwa rozdziały znajdujące się na końcu dysertacji: streszczenie pracy w języku polskim oraz streszczenie pracy w języku angielskim.

Treść całej pracy doktorskiej została dodatkowo podzielona na liczne podrozdziały wyodrębnione w „**Spisie treści**”, co nadaje pracy dużą przejrzystość i czytelność. Rozprawa doktorska Pani mgr Zyty Waraczewskiej ma również bogatą dokumentację graficzną, zawierającą szczegółowe wyniki poparte analizą statystyczną.

Układ omawianej pracy jest poprawny, czytelny i niebudzący większych zastrzeżeń. Ponadto poszczególne rozdziały i podrozdziały są ze sobą logicznie powiązane, stanowią całość, co ułatwia śledzenie i merytoryczną ocenę uzyskanych wyników. Generalnie recenzowana rozprawa doktorska jest napisana językiem poprawnym stylistycznie, pozwalającym w łatwy sposób na dokładne śledzenie toku prowadzonych badań i rozwiązań naukowych. Praca nie jest jednak wolna od drobnych błędów i pomyłek redakcyjnych. Ponadto w tekście zauważyłam również drobne błędy literowe i interpunkcyjne, których tu nie wymieniam. Drobne błędy, czy też uogólnienia słowne tj. np. „*lepszy wynik*”, „*niewiele wyższy/nniższy*”, „*silny wpływ lub silny związek między badanymi parametrami*” nie mają jednak wpływu na prawidłowy i pozytywny odbiór rozprawy i nie są przeszkodą merytoryczną w zrozumieniu treści. Niemniej jednak w przyszłości podczas opracowywania wyników badań do publikacji powinny być poprawione.

### **3. Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej**

**Pierwszy rozdział** pracy doktorskiej zatytułowany „**Wstęp**” to jednostronicowy opis tematyki przedmiotu wprowadzający czytelnika w zakres prowadzonych badań.

W drugim rozdziale zatytułowanym „**Przegląd literatury**” autorka na 26 stronach przedstawia aktualny stan wiedzy z zakresu znaczenia roślin bobowatych w rolnictwie oraz ich wpływu na środowisko glebowe. Ponadto opisuje szczegółowo proces biologicznego wiązania azotu atmosferycznego oraz charakteryzuje bakterie promujące wzrost roślin. Dość pobieżnie opisany jest podrozdział „**Ogólna charakterystyka bakterii endofitycznych**”, w którym w mojej ocenie zabrakło aktualnych definicji endofitów i najnowszych cytowań literatury. Aspekt zastosowania endofitów w uprawie roślin bobowatych jest bowiem w dysertacji jednym z wiodących tematów. Pomimo tej drobnej uwagi w mojej opinii rozdział stanowiący przegląd literatury został napisany rzetelnie z uzasadnieniem istoty i potrzeby prowadzonych badań. Treść powyższego rozdziału jest trafnie dobrana i świadczy przede wszystkim o bardzo dobrym czytaniu Doktorantki i znajomości tematu.

Rozdział trzeci, czyli „**Problemy badawcze**” to jednostronicowy spis pięciu pytań jakie zadała sobie Doktorantka, i na które próbowała uzyskać odpowiedzi w ramach prowadzonych wielokierunkowych prac badawczych. Tak postawione na początku badań pytania z pewnością ułatwiły Doktorantce późniejsze analizowanie otrzymanych wyników badań.

Kolejny rozdział dysertacji to „**Hipotezy badawcze**”, w którym Doktorantka przedstawia dwie główne i słusznie postawione hipotezy badawcze. Piąty rozdział dysertacji stanowi jasno postawiony cel pracy. W mojej opinii cel badań oraz hipotezy badawcze zostały poprawnie zaplanowane a w toku realizacji badań Doktoranta uzyskała wyniki dające na nie odpowiedź.

Rozdział szósty pracy „**Materiały i metody**” obejmuje zwarty opis zastosowanych metod oraz warunków przeprowadzonych badań, liczy 27 stron. W tej części pracy zdecydowanie brakuje dokładnego opisu pochodzenia wybranych preparatów handlowych (producent, rok, numer partii) oraz charakterystyki bakterii endofitycznych użytych do koinkultacji. Doktorantka podaje jedynie, iż pochodzą one z kolekcji Katedry Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej UP w Poznaniu. Na tym etapie pracy niestety nie wiadomo, czy były to rzeczywiście endofity, jak zostały wyizolowane oraz czy zostały scharakteryzowane pod kątem genetycznym i metabolicznym. W tym miejscu jeśli są takie badania należałoby powołać się na dostępną literaturę lub wcześniejsze badania pracowników Katedry. Doktorantka także nie podaje dlaczego do badań wybrała właśnie te

dwa konkretne szczepy bakterii oraz jakie ich cechy zadecydowały o słuszności tego wyboru. Ponadto w opisie tekstu „Materiały i metody” błędnie podano pochodzenie preparatu o nazwie handlowej Nitragina. IUNG-PIB w Puławach prowadzi sprzedaż swoich preparatów wyłącznie na perlicie jako nośniku. Zastosowany w badaniach preparat najprawdopodobniej pochodził z Zakładu Przetwórczo-Uługowo-Handlowego „BIOFOOD s.c.” w Wałczu. Brak tej informacji może być mylący dla czytelnika.

W kolejnej części rozdziału „Materiały i metody” Doktoranta szczegółowo i poprawnie opisuje zastosowane metody badań wraz z podaniem szczegółowych warunków ich wykonania. Opisy metod dotyczą wszystkich kolejnych poziomów badań prowadzonych przez Doktorantkę zaczynając od izolacji bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium* z preparatów handlowych, poprzez określenie wzajemnych interakcji pomiędzy zastosowanymi bakteriami wyizolowanymi z preparatów oraz endofitami, ocenę wpływu koinokulacji na plon roślin, ocenę liczebności bakterii endofitycznych w kolonizacji korzenia łubinu białego poprzez szeroko zaplanowane doświadczenia polowe wraz z oceną wpływu zastosowanych kombinacji koinokulacji nasion na aktywność biologiczną gleby, aktywność nityfikacji, intensywność fotosyntezy oraz plon roślin. W mojej opinii w zaplanowanej metodyce badań zdecydowanie zabrakło przeprowadzenia doświadczeń w warunkach kontrolowanych np. w fitotronie. Rezultaty tych badań np. w trzech niezależnych powtórzeniach mogłyby wskazać spośród badanych dziewięciu kombinacji ten najefektywniejszy wariant. Niestety wyniki uzyskane z trzyletnich doświadczeń polowych przy bardzo zmiennych warunkach atmosferycznych nie pozwoliły Doktorantce jednoznacznie na potwierdzenie tego jednego, najefektywniejszego czynnika.

Na uwagę zasługują także badania molekularne, które Doktorantka przeprowadziła na wybranej grupie próbek glebowych. W tym miejscu mam pytanie dlaczego wybrano do badań molekularnych właśnie próbki glebowe z 2018 roku? Zasadnym byłoby zastosowanie tych badań w każdym roku lub po zakończonym trzyletnim okresie prowadzenia badań polowych. Niemniej jednak ta część badań wprowadza do całości uzyskanych wyników bardzo ciekawe uzupełnienie. Moje kolejne pytanie do tej części dysertacji dotyczy opisu wybranych kombinacji doświadczenia. Dlaczego nie uwzględniono w schemacie czynników doświadczenia kombinacji łączącej wyizolowany szczep *Bradyrhizobium* wraz z *Pseudomonas fluorescens* i *Bacillus subtilis*?

Ponadto na pochwałę zasługuje także rzetelny opis i dobrze dobrany, szeroki zestaw analiz statystycznych. Świadczy to o dobrej znajomości, doświadczeniu i bogatym warsztacie Doktorantki w wykonywaniu analiz statystycznych.

Najobszerniejszą częścią dysertacji jest **rozdział ósmy „Wyniki”** liczący aż 73 strony. W kolejnych podrozdziałach Doktorantka szczegółowo i poprawnie omawia uzyskane wyniki badań. Wszystkie analizy poparte są także odpowiednio dobraną analizą statystyczną. Cenną częścią pracy są także wyniki uzyskane z doświadczeń polowych. Niemniej jednak w mojej opinii dość mylące dla czytelnika są objaśnienia pod rysunkami i tabelami. W rozdziale „Materiały i metody” na stronie 44 Doktorantka poprawnie podaje dokładny opis zastosowanych dziewięciu poziomów badanego czynnika, gdzie opisuje np. poziom 6 jako „nasiona koinokulowane *Bradyrhizobium* sp. wyizolowanym z Nitraginy + *Pseudomonas fluorescens*”. Natomiast w rozdziale „Wyniki” wszystkie tabele i ryciny podpisane są już przykładowo dla punktu 6 „nasiona koinokulowane preparatem Nitragina + *Pseudomonas fluorescens*”. Przy takim zapisie czytelnik nie wie, czy nasiona inokulowano wyizolowanym z preparatu szczepem czy też samym preparatem z dodatkiem wybranego endofitu. Jest to szczególnie ważne przy późniejszym publikowaniu wyników badań.

Ponadto Doktorantka poprawnie interpretuje uzyskane wyniki badań z doświadczeń polowych dla każdego roku oddzielnie. Ze względu na dużą zmienność warunków pogodowych w poszczególnych latach badań analiza statystyczna łącząca trzy lata badań nie jest możliwa. Tą część dysertacji dotyczącą szczegółowego omówienia poszczególnych wyników badań oceniam bardzo wysoko. Doktorantka skrupulatnie i poprawnie omówiła każdy z badanych paramentów a uzyskane wyniki poparła analizą statystyczną. Z pewnością uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań będą cenną wskazówką dla praktyki rolniczej.

Odnosząc się do tej części pracy (pomimo moich powyższych wątpliwości i uwag) uważam, że Doktorantka zaplanowała i przeprowadziła poprawnie badania zgodnie z obowiązującą metodologią. Opis oraz interpretacją uzyskanych wyników badań jest przejrzysty, czytelny, wykonany z należytą starannością i co warto podkreślić udokumentowany licznymi tabelami i rycinami zawierającymi także analizy statystyczne. Podsumowując, rozdział ten od strony merytorycznej jest opisany poprawnie i kompetentnie. Niewielkie wspomniane przez mnie braki w opisie i zobrazowaniu wyników mogą być uzupełnione na etapie przygotowywania publikacji naukowych.

Równie wysoko oceniam rozdział zatytułowany „**Dyskusja**”, gdzie na 20 stronach Doktorantka w sposób poprawny i rzetelny zestawia otrzymane wyniki na tle aktualnej literatury. Dyskusja zakończona jest dwustronicowym podsumowaniem, które ułatwia czytelnikowi wyodrębnienie najistotniejszych wyników badań.

W rozdziale IX „**Wnioski**” Doktorantka przedstawiła najważniejsze wnioski z przeprowadzonych badań. Doktorantka sformułowała sześć głównych wniosków. Niemniej jednak sformułowania tych wniosków powinny zostać poprawione, bowiem nie są wolne od błędów i uproszczeń językowych. Np. we wniosku drugim „*lepszy okazał się szczep*” (raczej bardziej aktywny), czy też we wniosku nr 6 „konsorcjum złożone z Nitraginy + *Bacillus subtilis*” (konsorcjum stanowiące szczep wyizolowany z preparatu Nitragina + *Bacillus subtilis*).

Rozdział X zatytułowany „**Bibliografia**” stanowiący spis literatury to spis aż 412 pozycji literaturowych, z czego ponad 80% stanowi literatura anglojęzyczna. Dowodzi to bardzo dobremu przygotowaniu Doktorantki do podjętego tematu, dużemu odczytaniu i znajomości aktualnej literatury przedmiotu.

Kończącą część dysertacji stanowią rozdziały XI i XII, które stanowią poprawnie przygotowane streszczenie w języku polski i angielskim.

#### **4. Wniosek końcowy**

Podsumowując prezentowana rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wykazuje szeroką wiedzę teoretyczną Pani mgr Zyty Waraczewskiej. Jednocześnie stanowi **niezwykle kompleksowe i praktyczne opracowanie** dotyczące wpływu koinokulacji na aktywność mikrobiologiczną gleby, proces diazotrofii i plonowanie łąbinu białego (*Lupinus Albus* L.). Doktorantka dowiodła, iż posiada wiedzę w powyższej tematyce, jak również potrafi zaplanować i właściwie przeprowadzić badania metodyczne związane z powyższą tematyką. Moim zdaniem sformułowany problem badawczy został w pełni osiągnięty. Lektura dysertacji robi bardzo dobre wrażenie, a wykazane w tekście uwagi recenzentki nie ujmują wartości pracy. Wykorzystany przez Doktorantkę warsztat naukowo-badawczy jest bardzo szeroki, a uzyskane wyniki umożliwiły osiągnięcie zakładanego na wstępie celu pracy. Praca nie budzi zastrzeżeń pod względem formalnym i merytorycznym. Na uznanie zasługuje dobrze przemyślany plan badań i dobór metod badawczych.



W świetle powyższej oceny, rozprawa spełnia aktualne wymagania merytoryczne i formalne, które zostały określone w art. 13 Ustawy o Stopniach i Tytule Naukowym z 14 marca 2003 r. (Dz. U. nr 65 poz. 595 wraz z późniejszymi zmianami). Wnoszę więc do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Zyty Waraczewskiej do kolejnych etapów postępowania doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na duże walory poznawcze i aplikacyjne otrzymanych wyników badań oraz zwracając szczególną uwagę na jego wymiar praktyczny oraz możliwość podniesienia świadomości społeczeństwa w zakresie stosowania biopreparatów w rolnictwie wnoszę wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Zyty Waraczewskiej stosowną nagrodą.



*Anna Gałązka*  
dr hab. Anna Gałązka, prof. IUNG-PIB

Jednostka organizacyjna IUNG-PIB Zakład Mikrobiologii Rolniczej  
Osoba do kontaktu: dr hab. Anna Gałązka, prof. IUNG-PIB  
Telefon: 814786950  
Adres e-mail: agalazka@iung.pulawy.pl