



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Poznań, 26.04.2024r.

dr hab. inż. Agnieszka Wolna-Maruwka, prof. UPP
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Rolnictwa Ogrodnictwa i Biotechnologii
Katedra Gleboznawstwa i Mikrobiologii
ul. Szydlowska 50
60-656 Poznań

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej

Mgr Jakuba Dobrzyńskiego

pt. „Występowanie względnie beztlenowych, przetrwalnikujących bakterii celulolitycznych
w glebie różnie użytkowanej rolniczo”

1. Podstawa opracowania recenzji

Rozprawa doktorska mgr Jakuba Dobrzyńskiego wykonana została w Instytucie Technologiczno – Przyrodniczym BIP w Falentach pod kierunkiem promotora dr hab. inż. Ewy Beaty Górskiej, prof. SGGW oraz promotora pomocniczego dr hab. inż. Barbary Wróbel, prof. ITP-PIB. Recenzję wykonano w związku z uchwałą nr 1007/ITP-PIB/2024 Rady Naukowej ITP-PIB z dnia 14 marca 2024 roku, dotyczącą wyznaczenia recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Jakuba Dobrzyńskiego, podpisaną przez Przewodniczącą Rady Naukowej ITP-PIB prof. dr hab. inż. Artura Hugo Świergiela oraz umową na wykonanie recenzji z dnia 8 kwietnia 2024 roku, podpisaną przez Dyrektora ITP-PIB prof. dr hab. inż. Wiesława Dembka.

2. Ogólna charakterystyka – zasadność podjęcia tematu

Zbyt intensywna gospodarka rolna oparta o uproszczoną strukturę zasiewów, intensywną uprawę roli, niewłaściwe zarządzanie nawozami mineralnymi i chemicznymi środkami ochrony roślin, przyczynia się do zachwiania równowagi biologicznej gleby. Przejawia się to głównie zaburzeniami przemian składników pokarmowych, uodpornieniem patogenów i szkodników, jak również zmniejszeniem bioróżnorodności mikroorganizmów glebowych.

Obecnie przed rolnictwem stawia się więcej wyzwań, niż tylko produkcję produktów rolnych. Współczesne rolnictwo musi uwzględniać bowiem również czynnik pozaprodukcyjny, czyli utrzymanie produktywności gleby na danym poziomie, przy jednoczesnym pozytywnym wpływie praktyk rolniczych na środowisko glebowe oraz ograniczanie zmian klimatu.

Dobrym rozwiązaniem zrównoważonej uprawy roślin, wychodzącym jednocześnie naprzeciw wymaganiom programów unijnych jest racjonalne gospodarowanie materią organiczną, wprowadzaną do gleby między innymi w postaci nawozów naturalnych, wspierane dodatkowo działaniem autochtonicznych mikroorganizmów glebowych.

Drobnoustroje odgrywają kluczową rolę w udostępnianiu składników pokarmowych roślinom, jak również w tworzeniu związków próchnicznych. Ważną grupą mikroorganizmów zaangażowanych w mineralizację materii organicznej w glebie są bakterie celulolityczne. Celuloza jako główny element składowy ścian komórkowych roślin jest najliczniej występującym polimerem organicznym w glebie, dlatego tak istotna jest analiza potencjału społeczności bakterii celulolitycznych.

W literaturze przedmiotu niewiele jest informacji na temat wpływu nawożenia i rodzaju uprawy na zmiany składu ilościowego i jakościowego przetrwalnikujących bakterii celulolitycznych w glebie, dlatego tematyka badań podjętych przez Pana mgr Jakuba Dobrzyńskiego jest aktualna i interesująca, pozwalająca na pogłębienie wiedzy z tego zakresu. Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej mają w szczególności charakter badań podstawowych, przyczyniają się do pogłębienia wiedzy nad zagadnieniami dotyczącymi reakcji względnie beztlenowych, przetrwalnikujących bakterii celulolitycznych oraz potencjalnie celulolitycznych na monokulturę, rodzaj płodozmianu oraz nawożenie obornikiem bydlęcym, w prawie 100-letnim eksperymencie polowym, jednym z najstarszych nadal kontynuowanych w Europie. Natomiast ze względu na wyselekcjonowanie izolatu bakterii o wysokim potencjale celulolitycznym, zdolnym do produkcji celulaz w szerokim zakresie wartości temperatury i pH, który może posłużyć do opracowania biopreparatu stosowanego zarówno w rolnictwie, jak i w przemyśle chemicznym, przeprowadzone badania mają również wymiar praktyczny.

Potwierdzam za w pełni zasadne podjęte przez Doktoranta badania dotyczące wpływu różnych praktyk zarządzania glebą na skład i różnorodność taksonomiczną jednej z najistotniejszej społeczności drobnoustrojów glebowych, warunkującej nie tylko żyzność gleby, ale odpowiadającej również za ochronę sanitarną roślin uprawnych. Uważam, że problematyka pracy dotyczy istotnych zagadnień związanych z ochroną środowiska glebowego, które w pełni nawiązują do założeń Europejskiej Strategii Bioróżnorodności (2020).

3. Formalna ocena rozprawy

W skład opracowania wchodzi trzy oryginalne publikacje naukowe o łącznym sumarycznym *Impact Factor* wynoszącym 11,249 oraz liczbie punktów wg wykazu MEiN równej 340 (zgodnie z rokiem wydania). Jedna z nich finansowana była ze środków Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego, w ramach projektu numer SPUB 505-30-012600-L00280-99 (Decyzja 8762E-385SPUB201).

Zbiór ten stanowi zwięzłe omówienie podjętego w ramach rozprawy doktorskiej problemu badawczego, zawartego w publikacjach naukowych opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, takich jak *Agriculture MDPI* i *Agronomy MDPI*:

P1 Dobrzyński, J.; Wróbel, B.; Górka, E.B. Taxonomy, Ecology, and Cellulolytic Properties of the Genus *Bacillus* and Related Genera. *Agriculture* 2023, 13, 1979. <https://doi.org/10.3390/agriculture13101979>

P2 Dobrzyński, J.; Wierzchowski, P.S.; Stępień, W.; Górka, E.B. The Reaction of Cellulolytic and Potentially Cellulolytic Spore-Forming Bacteria to Various Types of Crop Management and Farmyard Manure Fertilization in Bulk Soil. *Agronomy* 2021, 11, 772. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040772>

P3 Dobrzyński, J.; Wróbel, B.; Górka, E.B. Cellulolytic Properties of a Potentially Lignocellulose-Degrading *Bacillus* sp. 8E1A Strain Isolated from Bulk Soil. *Agronomy* 2022, 12, 665. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030665>

Wszystkie prace są współautorskie, a Doktorant jest autorem wiodącym w każdej z nich, brakuje jednakże informacji na temat udziału procentowego każdego z autorów. Z załączonych w manuskryptach oświadczeń dotyczących współautorstwa wynika, że indywidualny wkład mgr Jakuba Dobrzyńskiego w przygotowaniu prac dotyczył tworzenia koncepcji, wykonania analiz laboratoryjnych, opracowania strony graficznej prac, jak również napisania i przygotowania publikacji do druku oraz ustosunkowania się do uwag recenzentów. Świadczy to o dojrzałości naukowej Doktoranta oraz potwierdza Jego kluczową rolę na wszystkich etapach powstawania dysertacji.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Jakuba Dobrzyńskiego składa się z dwóch części, obejmujących łącznie 85 stron. Pierwsza, licząca 38 stron prezentuje w sposób klasyczny dla rozpraw naukowych wprowadzenie w zakres prowadzonych analiz, następnie cel badań i postawione hipotezy badawcze, metodologię zastosowaną w przeprowadzonych doświadczeniach oraz syntezę wyników z zakresu oceny wpływu systemów monokultury i płodozmianu oraz nawożenia obornikiem bydlęcym na liczebność oraz skład taksonomiczny społeczności przetrwalnikujących bakterii celulolitycznych oraz potencjalnie celulolitycznych w glebie pozaryzosferowej. Ponadto przedstawia wyniki badań dotyczące identyfikacji oraz

oceny właściwości biochemicznych wybranych izolatów bakterii celulolitycznych z długoterminowo użytkowanej gleby, na podstawie których wyselekcjonowany został jeden szczep bakterii, predysponowany do skonstruowania biopreparatu mikrobiologicznego.

Całość zamyka obszerny i wieloaspektowy spis literatury, który zawiera w większości prace opublikowane w języku angielskim. Natomiast druga część manuskryptu jest dokumentacją rozprawy doktorskiej i zawiera trzy opublikowane prace naukowe.

Stwierdzam, że układ przedłożonej do recenzji rozprawy nie budzi zastrzeżeń pod względem formalnym. Przygotowana została starannie, a dokumentacja publikacyjna potwierdza, że badania zostały wykonane prawidłowo.

4. Merytoryczna ocena pracy

Pierwszy rozdział dysertacji zatytułowany „Wprowadzenie” odnosi się do podstaw literaturowych rozważanych aspektów. Doktorant precyzyjnie przedstawia w nim najważniejsze zagadnienia dotyczące wpływu różnych praktyk agrotechnicznych, opartych na stosowaniu środków ochrony roślin, długotrwałym i jednostronnym nawożeniu mineralnym i monokulturze na różnorodność mikroorganizmów glebowych, w szczególności na skład ilościowy i jakościowy względnie beztlenowych, przetrwalnikujących bakterii celulolitycznych zaliczanych do typu *Firmicutes*.

Podkreślając, że mikroorganizmy odpowiedzialne są w dużej mierze za kierunek procesów biochemicznych zachodzących w glebie, co przekłada się na wysokość plonu roślin, przechodzi do tematyki dotyczącej wpływu czynników środowiskowych na tempo mikrobiologicznego rozkładu celulozy. Następnie przytacza przykłady glebowych bakterii celulolitycznych oraz enzymów przez nie produkowanych, zwracając uwagę, że najbardziej interesującą grupę mikroorganizmów celulolitycznych stanowią względnie beztlenowe bakterie przetrwalnikujące. Zdolność do produkcji endospor, a tym samym większa odporność na niekorzystane warunki środowiskowe sprawiają, że niniejsze drobnoustroje mogą być wykorzystywane jako czynniki promujące wzrost roślin.

Układ treści w niniejszym rozdziale uważam za logiczny, a poszczególne tematy ułożone są w prawidłowej kolejności. Moim zdaniem brakuje jednakże informacji konkretnie jaki kierunek zastosowania celulolitycznego izolatu *Bacillus* sp. Autor ma na myśli. W opracowaniu zawarta jest jedynie ogólna informacja o możliwości stosowania tego typu bakterii w rolnictwie lub przemyśle do rozkładu związków lignocelulozowych. Dlatego proszę o wyjaśnienie kwestii zastosowań omawianych mikroorganizmów, ze wskazaniem czy podobne biopreparaty na rynku polskim istnieją i jaka jest skuteczność ich działania?

Kolejny rozdział dysertacji stanowi jasno sprecyzowany cel pracy. W związku z kompleksowością i wielowątkowością podjętej tematyki badawczej, Autor przedstawił jeden główny oraz dwa szczegółowe cele badawcze, które korespondują z jasno i precyzyjnie sformułowaną hipotezą badawczą, zakładającą istnienie zależności pomiędzy rodzajem uprawy i nawożenia gleby a występowaniem i kształtowaniem składu taksonomicznego społeczności przetrwalnikujących bakterii celulolitycznych w glebie pozaryzosferowej.

Metodologię dysertacji zaprezentowano w postaci trzech odrębnych rozdziałów, zatytułowanych: „Schemat doświadczenia”, „Wybór metody badawczej pozwalającej na określenie występowania WBPBC w glebie rolniczej – konkluzje z publikacji nr 1” oraz „Metody badawcze wykorzystane w pracy doktorskiej”. Po przeczytaniu tej części dysertacji, zalecałabym stworzenie jednego rozdziału zatytułowanego „Materiał i metody badawcze zastosowane w pracy doktorskiej” i dodatkowych podrozdziałów, w których zawarte byłyby techniki badawcze użyte w kolejnych doświadczeniach, składających się na rozprawę doktorską.

W tej części opracowania Doktorant ogólnie opisał wykorzystane w badaniach metody analityczne, co uważam za dopuszczalne z uwagi na szczegółowy opis metodyczny przeprowadzonych doświadczeń, przedstawiony w poszczególnych artykułach naukowych wchodzących w skład dysertacji.

Uważam, że mgr Jakub Dobrzyński wykazał wysoką umiejętność wyboru i łączenia technik badawczych. Na tej podstawie mogę stwierdzić, że w stopniu bardzo dobrym opanował warsztat badawczy. Począwszy od standardowych metod dotyczących oznaczenia liczebności mikroorganizmów celulolitycznych metodą NPL oraz określenia poziomu aktywności celulolitycznej wybranych izolatów bakterii przetrwalnikujących, przeprowadził identyfikację taksonomiczną bakterii na podstawie hiperzmiennego regionu V4 w genach 16S rRNA.

Omówienie najważniejszych wyników badań uzyskanych w poszczególnych eksperymentach w połączeniu z ich dyskusją zaprezentowano w postaci osobnych rozdziałów. Jest to część pracy napisana w sposób przejrzysty i zrozumiały. Publikacja przeglądowa stanowiąca część rozprawy doktorskiej sprawnie wprowadza czytelnika w podjętą tematykę badawczą, co świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktoranta.

Omawiając wyniki w każdym bloku tematycznym mgr Jakub Dobrzyński odnosił się do poszczególnych, opublikowanych artykułów naukowych, co ułatwiło analizę uzyskanych rezultatów badań i pozwoliło na uzyskanie istotnych informacji na temat wpływu systemów monokultury i płodozmianu oraz nawożenia obornikiem bydlęcym na liczebność oraz różnorodność taksonomiczną bakterii celulolitycznych oraz potencjalnie celulolitycznych,

tworzących przetrwalniki w glebie z prawie stuletniego doświadczenia nawozowego. Ponadto przyczyniło się do pogłębienia wiedzy na temat przynależności systematycznej taksonów celulolitycznych bakterii przetrwalnikujących najczęściej izolowanych z gleby, ich zdolności do rozkładu różnych związków węgla, jak również poziomu aktywności celulaz produkowanych przez autochtoniczny szczep *Bacillus* sp. w zależności od zmiennych warunków środowiskowych.

Kolejny rozdział rozprawy stanowią „Wnioski”, w którym Doktorant sformułował sześć trafnych wniosków odpowiadających na cele badań, z których wynika, że płodozmian i długoterminowa uprawa w monokulturze w przeciwieństwie do obornika bydlęcego mają stosunkowo niewielki wpływ na różnorodność i kształtowanie społeczności mikroorganizmów glebowych. We wszystkich wariantach doświadczalnych odnotowano bowiem dominację tych samych rzędów bakterii, tj. *Brevibacillales*, *Paenibacillales*, *Bacillales* oraz rodzin, takich jak *Brevibacillaceae*, *Paenibacillaceae* i *Clostridiaceae*.

Wykazano również, że izolacja kilkudziesięciu szczepów bakterii przetrwalnikujących i analiza wybranych ich parametrów biochemicznych pozwoliła na wytypowanie jednego izolatu o najsilniejszych właściwościach celulolitycznych, analizowanych w różnych zakresach wartości temperatury i pH podłoża, który zakwalifikowano do rodzaju *Bacillus*. Uważam, że powyższe wyniki badań mają duży aspekt praktyczny, dający perspektywy do rozwoju nowych rozwiązań w zrównoważonym rolnictwie.

W trakcie analizy niniejszej dysertacji nasunęło mi się jednakże kilka uwag oraz następujących pytań, dlatego proszę o ustosunkowanie się do nich:

- Proszę o ujednoczenie pisowni nazw łacińskich zgodnie z Międzynarodowym Kodeksem Nomenklatury Bakterii.
- Dlaczego w obserwacji taksonomicznej bakterii celulolitycznych skupił się Pan na określeniu zawartości OTU rzędów i rodzin, pomijając typy, rodzaje, czy też gatunki bakterii?
- Czy Pana zdaniem uzyskane informacje dotyczące zastosowania wyselekcjonowanego szczepu *Bacillus* sp. w rolnictwie są wystarczające, żeby stosować je w warunkach *in vivo*, czy może warto byłoby przeprowadzić jeszcze dodatkowe badania, które pozwoliłyby na zwiększenie skuteczności ich działania w promowaniu wzrostu roślin (np. ocena produkcji fitohormonów, solubilizacji fosforu i potasu, czy właściwości antyfungistatyczne)?

- Czy uważa Pan, że mogą występować jakiegokolwiek zagrożenia środowiskowe związane z cykliczną i długoterminową, doglebową lub dolistną aplikacją mikroorganizmów z rodzaju *Bacillus* sp., przeznaczonych do promowania wzrostu roślin?

5. Wniosek końcowy

Reasumując stwierdzam, że prezentowana rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wnosi ważny wkład w rozwój dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo. Doktorant dowiódł, że posiada wiedzę w powyższej tematyce, co przełożył na prawidłowy dobór metod badawczych, precyzyjne wyartykułowanie założeń oraz przemyślane zaprezentowanie wyników badań w postaci monotematycznego cyklu publikacji. Uważam, że przedstawione do oceny prace wnoszą wiele nowych aspektów o charakterze poznawczym i aplikacyjnym.

W świetle powyższej oceny recenzowana dysertacja spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późniejszymi zmianami), dlatego wnioskuję o jej dopuszczenie do kolejnych etapów postępowania doktorskiego.

A. Wolna-Maruwka

Poznań, 26.04.2024r.

dr hab. inż. Agnieszka Wolna-Maruwka, prof. UPP