

Dr hab. inż. Katarzyna Gleń-Karolczyk, prof. URK  
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie  
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny  
Katedra Mikrobiologii i Biomonitoringu

Kraków, 10.06.2024 r.

### **Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Jakuba Dobrzyńskiego**

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

wykonanej w Instytucie Technologiczno-Przyrodniczym,  
Państwowego Instytutu Badawczego w Falentach

Promotor rozprawy: dr hab. inż. Ewa Beata Górka, prof. SGGW

Promotor pomocniczy: dr hab. inż. Barbara Wróbel, prof. ITP-PIB

### ***Ocena problematyki rozprawy***

Podjęty przez Doktoranta temat badawczy uważam za aktualny i bardzo istotny dla produkcji roślinnej. Gleba jest środowiskiem, w którym żyją zorganizowane społeczności zróżnicowanych pod względem biologicznym mikroorganizmów reprezentowanych przez: bakterie, pierwotniaki, grzyby. Rola w obiegu materii i wzajemne oddziaływanie między poszczególnymi jednorodnymi populacjami drobnoustrojów oraz ich interakcje z roślinami i zwierzętami na ogół są dobrze poznane i precyzyjnie określone. Ciągłe jednak skomplikowany, dynamiczny, układ oddziaływań biologicznych i przemian fizykochemicznych w glebie jest wyzwaniem do wnikliwych badań. Szczególne miejsce zajmują tutaj, gleby wykorzystywane rolniczo gdyż ich żyzność i urodzajność gwarantuje uzyskiwanie wysokich plonów roślin, które są podstawą wyżywienia ludzi oraz zwierząt. Na przestrzeni lat obserwuje się zmiany w systemie gospodarowania, między innymi w zakresie ograniczenia stosowania nawozów „sztucznych” i chemicznych środków ochrony roślin. Opracowane systemy produkcji ekologicznej i integrowanej bazują na tych wytycznych. Ciągłe jednak w produkcji roślinnej popełnianych jest szereg błędów związanych z niewłaściwym zmianowaniem, uprawą w monokulturach, czy też rezygnacji z nawożenia organicznego co prowadzi do zachwiania równowagi biologicznej w uprawianych glebach.

W przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej podjęto próbę określenia wpływu różnych systemów uprawy roślin i nawożenia obornikiem na relatywną liczebność i różnorodność względnie beztlenowych przetrwalnikujących bakterii celuloリティcznych oraz względnie beztlenowych przetrwalnikujących bakterii potencjalnie celuloリティcznych (WBPBC). W kontekście problemu z rozkładem celulozy w glebie, a także dużym deficytem badań z tego zakresu praca doktorska mgr Jakuba Dobrzyńskiego nacechowana jest nowatorstwem, ma duże znaczenie naukowe i użytkarne. Opiera się o poprawne metody badawcze i analizy statystyczne oraz wystarczający materiał eksperymentalny.

### **Ocena formalna i merytoryczna rozprawy doktorskiej**

Osiągnięciem będącym podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo jest cykl trzech publikacji powiązanych tematycznie, ujętych pod wspólnym jasno sprecyzowanym tytułem: „Występowanie względnie beztlenowych, przetrwalnikujących bakterii celuloリティcznych w glebie różnie użytkowanej rolniczo”.

1) 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>

2) 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>

3) 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>

Publikacje naukowe są dostępne na internetowej stronie wydawnictwa naukowego MDPI oraz zaopatrzone w cyfrowy identyfikator dokumentu elektronicznego (DOI).

Łączna wartość naukometryczna publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe według listy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) zgodnie z rokiem opublikowania artykułów wynosi 340 punktów, a sumaryczny współczynnik wpływu impact factor (IF) 10.9. Wartość merytoryczna tych publikacji została oceniona przez ekspertów zajmujących się taką samą bądź zbliżoną problematyką.

We wszystkich przedstawionych oryginalnych pracach twórczych, Doktorant jest pierwszym autorem, a w pierwszej i trzeciej również korespondencyjnym. Istotne dla uznania

tych opracowań naukowych, jako elementu osiągnięcia naukowego Doktoranta, jest wykazanie Jego znaczącego udziału na wielu etapach powstawania wyżej wymienionych publikacji.

Przeprowadzona merytoryczna analiza treści przedłożonych 3 oryginalnych prac twórczych, a także opisu zawartego w pracy doktorskiej (Autoreferacie), pozwala na bezsporne uznanie ich za jedno tematyczny cykl publikacji naukowych. Przy czym dwie spośród nich mają charakter badawczy, a jedna stanowi metaanalizę poświęconą taksonomii bakterii z rodzaju *Bacillus* i pokrewnych rodzajów należących do typu Firmicutes oraz ich ekologię i właściwości celulolityczne. Publikacje naukowe składające się na oceniane osiągnięcie naukowe zostały opisane na 38 stronach pracy doktorskiej. Układ pracy i kolejność zamieszczonych rozdziałów jest odpowiedni dla tego typu opracowań naukowych. Dysertacja składa się z 11 rozdziałów: 1 – *Wprowadzenie*, 2 – *Spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej* 3 – *Problematyka, cel i hipoteza badawcza rozprawy doktorskiej* (trzy podrozdziały) 4 – *Schemat doświadczenia*, 5 - *Wybór metody badawczej pozwalającej na określenie występowania WBPBC w glebie rolniczej – konkluzje z publikacji nr 1*, 6 – *Metody badawcze wykorzystane w pracy doktorskiej*, 7 - *Reakcja celulolitycznych i potencjalnie celulolitycznych bakterii przetrwalnikujących na różne rodzaje upraw i nawożenie obornikiem w glebie – wyniki i dyskusja publikacji nr 2* Bibliografia, 8 - *Właściwości celulolityczne Bacillus sp. 8E1A wyizolowanego z gleby pozaryzosferowej – wyniki i dyskusja publikacji nr 3*, 9 - *Wnioski*, 10 – *Bibliografia*, 11 – *Aneks. Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej*.

Wszystkie treści zawarte w poszczególnych rozdziałach i podrozdziałach są adekwatne do ich nazw. Jednak uważam, że połączenie niektórych treści jak i rozdziałów (podrozdziałów) pozwoliłoby na uniknięcie powtarzanych kwestii jak i łatwość odbioru. Ponadto w nazwach rozdziałów 2, 3, 6 i 11 na można było pominąć zapis „rozprawy doktorskiej” czy „pracy doktorskiej” (to oczywiste o jaką pracę chodzi).

W rozdziale 1. *Wprowadzenie* Doktorant umiejętnie zaprezentował problematykę badawczą. Przedstawił wpływ niewłaściwych praktyk rolniczych takich jak: zaniechanie stosowania zmianowania, uprawa roślin w monokulturze czy jednostronnego nawożenia mineralnego na zmniejszenie plonów, nagromadzenie czynników patogenicznych, ograniczenie bioróżnorodności oraz zachwianie równowagi biologicznej w glebie. Z kolei „stosowanie środków ochrony roślin” (to zbyt duże uogólnie) z pewnością zmniejsza bioróżnorodność środowiska glebowego, ale sprzyja osiąganiu wysokich plonów i polepsza ich jakość. Środki ochrony roślin są podstawą w nowoczesnych technologiach uprawy roślin. Dlatego w tym miejscu proszę Doktoranta o ustosunkowanie się do kwestii, wpływu

poszczególnych grup środków ochrony (zgodnie z ich aktualną definicją) na różnorodność mikroorganizmów w glebie. Jaka jest zatem rola bakterii promujących wzrost i rozwój roślin czy też różnych grup biostymulatorów w kształtowaniu bioróżnorodności gleb?

Przeważająca część 1. *Wprowadzenia* adekwatnie do tematu pracy doktorskiej dotyczy, celulozy występującej w środowisku glebowym, rozkładających ją enzymów produkowanych przez bakterie i warunków środowiskowych sprzyjających degradacji celulozy.

Uważam, że do rozdziału 1. *Wprowadzenie*, mogły być dołączone treści charakteryzujące problematykę badawczą, które są zawarte w rozdziale 3. *Problematyka, cel i hipoteza badawcza rozprawy doktorskiej*. Z kolei cel i hipoteza badawcza mogły stanowić oddzielny rozdział.

Przyjęta hipoteza badawcza, cel i cele szczegółowe pracy są poprawne i jasno przedstawione, a w dalszej części rozprawy konsekwentnie realizowane. Chociaż odnoszę wrażenie, że pierwszy cel szczegółowy jest zbieżny z celem głównym.

Analizując kolejne rozdziały począwszy od 4 do 7 stwierdzam, że dla integralności pracy powinny być ujęte w jednym rozdziale „Materiał i metody” Schemat doświadczenia to nierozłączna część metodyki. Treści z rozdziału 5. *Wybór metody badawczej pozwalającej na określenie występowania WBPBC w glebie rolniczej – konkluzje z publikacji nr 1*, przedstawiają problem, a nie opis metody badawczej - oznaczenia występowania względnie beztlenowych przetrwalnikujących bakterii celulolitycznych. Z kolei w rozdziale 6. *Metody badawcze wykorzystane w pracy doktorskiej*, Doktorant ogólnie opisał metodę oznaczenia najbardziej prawdopodobnej liczby (NPL) badanych drobnoustrojów w glebie oraz skład i różnorodność taksonomiczną względnie beztlenowych przetrwalnikujących bakterii celulolitycznych (WBPB) (powielone treści z rozdz. 5), nie wskazał według czyjej metody wyliczono współczynnik bioróżnorodności Shannona-Winnera. Interesującym aspektem pracy doktorskiej jest wyłonienie spośród WBPBC izolatów bakterii przetrwalnikujących, które najintensywniej rozkładały celulozę i ta część pod względem metodycznym i zastosowanych procedur jest najlepiej opracowana.

Wyniki z przeprowadzonych badań Doktorant opisał i przedyskutował w rozdziałach 7 i 8. Pierwszy obszar badań zawarł w rozdziale 7, który dotyczył „Reakcji celulolitycznych i potencjalnie celulolitycznych bakterii przetrwalnikujących na różne rodzaje upraw i nawożenie obornikiem w glebie – wyniki i dyskusja publikacji nr 2.” Uważam, że konstrukcja stylistyczna tego zdania jest niepoprawna powinno być „ Reakcja glebowych bakterii celulolitycznych i psedocelulolitycznych przetrwalnikujących na różne rodzaje upraw i nawożenie obornikiem. A

może prościej, po prostu „Wpływ różnego rodzaju uprawy i nawożenia obornikiem na społeczności glebowych bakterii celulolitycznych i pseudocelulolitycznych przetwarzających. Wyniki tych badań w oryginalnej pracy nr 2 zawarte są w 2 tabelach i na 3 rycinach. Doktorant przeprowadził wnikliwą analizę wskaźników chemicznych gleb z 7 obiektów badawczych, określił: pH, zawartość C [%], N [ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ], określił stosunek C:N oraz NPL (najbardziej prawdopodobną liczbę) bakterii wyrażoną ilością jednostek tworzących kolonie przypadającą na  $\text{mL}^{-1}$  gleby oraz wskaźniki bioróżnorodności: Shannona i operacyjną jednostkę taksonomiczną (OTU) w glebie. Bardzo proszę o wyjaśnienie czy zastosowany wskaźnik OTU to powszechnie stosowany w badaniach populacyjnych wskaźnik bogactwa gatunków (S)?

Dyskusja jest interesującym opracowaniem, w którym Doktorant rezultaty swoich badań konfrontuje z zawartymi w literaturze. Należy podkreślić, że ze względu na niewielką ilość adekwatnych badań na Świecie i przy zróżnicowanych warunkach przeprowadzonych eksperymentów nie było to łatwe zadanie. Z pewnością dużą wartość poznawczą i użyteczną przedstawia identyfikacja rzędów i rodzin bakterii wchodzących w skład społeczności mikroorganizmów ukształtowanych pod wpływem zastosowanych wariantów zmianowania, nawożenia obornikiem czy upraw monokulturowych. Doktorant wskazuje, że gleby nienawożone obornikiem bydlęcym zarówno w zmianowaniu z udziałem roślin bobowatych (LRL) jak i bez ich udziału (ARP) sprzyjają występowaniu bakterii z rodziny Paenibacillaceae. Może mieć to duże znaczenie gospodarcze, zwłaszcza że wiele gospodarstw w Polsce boryka się z brakiem obornika w skutek czego spada bioróżnorodność gleb uprawnych, co wykazał również w swoich badaniach Doktorant. Z drugiej strony większa populacja szczepów bakterii rodzaju *Paenibacillus* może korzystnie wpływać na wzrost i rozwój roślin. W ostatnich latach dowiedziono i wciąż przeprowadzane są badania nad wykorzystaniem bakterii *Paenibacillus* w ochronie roślin, nie tylko jako czynnika ograniczającego porażenie roślin przez organizmy patogeniczne ale również jako biostymulatory. Przeprowadzone badania są ważnym krokiem na drodze do poznania wzajemnych oddziaływań międzygatunkowych w tym poznania wpływu stwierdzonych mikroorganizmów na rośliny. Należy jednak pamiętać, że oprócz wskazanych czynników agrotechnicznych, strukturę i liczebność populacji mikroorganizmów glebowych mogą istotnie determinować chociażby warunki hydro-termiczne. Odnośnie pracy nr 2 zawartej w aneksie i opisu na stronie 16 istnieje nieścisłość dotycząca terminu przeprowadzanych badań, czy był to rok 2016 czy 2017? Proszę ustosunkować się do kwestii wpływu lat badań na wyniki analiz mikrobiologicznych tzn. czy na tych samych siedmiu obiektach badawczych wyniki

analiz mikrobiologicznych przeprowadzonych w trzech kolejnych latach mogłyby znacząco różnić się od siebie?

Kolejny obszar badawczy obejmujący „Właściwości celulolityczne *Bacillus* sp. 8E1A wyizolowanego z gleby pozaryzosferowej” zaprezentowano w rozdziale 8, uznając za najbardziej istotny i rozwojowy. Doktorant spośród wyizolowanych szczepów bakterii wyodrębnił te, które wykazywały największą aktywność karboksymetylocelulazy (CMCazy). Wykorzystując analizę sekwencji 16S rRNA, zaklasyfikował do rodzaju *Bacillus* 6 szczepów: *Bacillus* sp. 15E1A (MZ481907), *Bacillus* sp. 24DV (MZ481906), *Bacillus* sp. 15AV2 (MZ481905), *Bacillus* sp. 14AV2 (MZ479750), *Bacillus* sp. 14AV1 (MZ479749), *Bacillus* sp. 8E1A (MZ479383) i jeden do *Paenibacillus*: *Paenibacillus* sp. 15AV1 (MZ482019). Następnie określił aktywność celulaz 8E1A w różnych zakresach temperatur. Posługując się licznymi doniesieniami z literatury odpowiednio szeroko rozwinął tę tematykę. Uważam, że w tym rozdziale Doktorant wyjątkowo starannie, z dużą wnikliwością i ogromnym ładunkiem danych zaprezentował aktualny stan wiedzy.

Autor przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej osiągnął zamierzone cele badawcze. W sześciu wnioskach zawarł najważniejsze osiągnięcia z przeprowadzonych badań. Wnioskowanie jest poprawne, wnioski sprecyzowane w sposób klarowny z dużą dozą uogólnienia.

#### **Wniosek końcowy**

Reasumując niezależnie od moich uwag krytycznych oraz pytań, nie mam najmniejszych wątpliwości, że w przedstawionej postaci dysertacja Pana mgr Jakuba Dobrzyńskiego jest bardzo wartościowym opracowaniem naukowym.

Ponadto biorąc pod uwagę zakres badań, przyjętą metodologię i zastosowane metody badawcze oraz sposób opracowania i przedstawienia wyników, rozprawę doktorską mgr Jakuba Dobrzyńskiego uznaję za w pełni spełniającą wymogi stawiane tego typu opracowaniom. Stwierdzam, że stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz mieści się w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

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.

