

dr hab. inż. Krzysztof Pakuła, prof. uczelni
Dyscyplina: rolnictwo i ogrodnictwo
Uniwersytet w Siedlcach
Wydział Nauk Rolniczych
Instytut Rolnictwa i Ogrodnictwa
ul. Prusa 14, 08-110 Siedlce

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgra Jakuba Dobrzyńskiego
pt.: **„Występowanie względnie beztlenowych, przetrwalnikujących bakterii
celulolitycznych w glebie różnie użytkowanej rolniczo ”**
wykonanej pod kierunkiem
promotora Pani dr hab. inż. Ewy Beaty Górskiej, profesora SGGW
i promotora pomocniczego Pani dr hab. inż. Barbary Wróbel, profesora ITP-PIB

1. Podstawa opracowania recenzji

Recenzja została wykonana w odpowiedzi na pismo Pana prof. dr hab. inż. Wiesława Dembka pełniącego obowiązki Dyrektora Instytutu Technologiczno-Przyrodniczego – Państwowy Instytut Badawczy w Falentach (DON-RN.19/2024) z dnia 8 kwietnia 2024 roku wraz z informacją, że na podstawie Uchwały nr 1007/ITP – PIB/2024 Rady Naukowej Instytutu Technologiczno-Przyrodniczego – Państwowy Instytut Badawczy w Falentach z dnia 14 marca 2024 roku o powołaniu mnie na recenzenta pracy doktorskiej mgra Jakuba Dobrzyńskiego pt.: **„Występowanie względnie beztlenowych, przetrwalnikujących bakterii celulolitycznych w glebie różnie użytkowanej rolniczo ”**.

2. Znaczenie podjętej problematyki badawczej

Gleba jest środowiskiem heterogennym i miejscem bytowania różnorodnych gatunków mikroorganizmów. Ze względu na swoją strukturę oraz właściwości fizykochemiczne

i chemiczne stanowi doskonały ekosystem dla rozwoju bakterii, które stanowią integralną część środowiska glebowego. Mają one bezpośredni i pośredni wpływ na funkcjonowanie ekosystemów, prawidłowy wzrost i rozwój roślin oraz strukturę i produktywność gleby. Ochrona różnorodności biologicznej, w tym mikroorganizmów glebowych, jest ważna z punktu widzenia zachowania równowagi przyrodniczej. To właśnie mikroorganizmy glebowe mają znaczny udział w kształtowaniu żyzności gleby, odgrywają główną rolę m.in. w udostępnianiu roślinom składników pokarmowych, zwalczaniu patogenów, tworzeniu próchnicy glebowej oraz w mineralizacji materii organicznej. W rezultacie tworzą się ściśle współzależności między glebą, mikroorganizmami a roślinami.

W ostatnich latach obserwujemy szybki wzrost produkcji rolnej. Jej intensyfikacja prowadzi do niekorzystnych zmian właściwości chemicznych, fizycznych i biologicznych gleby na skutek stosowania nawozów mineralnych i chemicznych środków ochrony roślin, uprawy roślin w monokulturze i ujemnego bilansu materii organicznej. Wiedza na temat wpływu zabiegów agrotechnicznych na zasobność i różnorodność biologiczną mikroorganizmów w glebie ma kluczowe znaczenie dla oceny jakości środowiska i bezpieczeństwa żywnościowego.

Celuloza jest najpowszechniejszym biopolimerem w glebie. Właściwości gleby, takie jak pH, wilgotność i zawartość materii organicznej wpływają na rozkład celulozy przez mikroorganizmy glebowe, wykazujące aktywność celulolityczną. Proces ten wymaga kompleksu enzymów należących do klasy hydrolaz O-glikozydowych.

Co roku bowiem na Ziemi produkuje się około 200 miliardów ton biomasy roślinnej, z czego około 90% stanowią odpady lignocelulozowe, których głównym składnikiem jest celuloza, która stanowi 40–55% suchej masy tych odpadów. Rozkład celulozy dokonywany jest przez enzymy celulolityczne produkowane przez: bakterie tlenowe i beztlenowe, np. bakterie z rodzaju *Bacillus*, *Butyrivibrio*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Paenibacillus* i *Ruminococcus*. Mimo to tylko niewielka liczba bakterii tworzących przetrwalniki może syntetyzować dużą ilość celulaz zdolnych do degradacji celulozy *in vitro*. Główne czynniki wpływające na właściwości celulaz *Bacillus* i rodzajów pokrewnych (w tym CMCazy, FPaza i Awicelaza) to temperatura, czas, pH i źródło celulozy. Badania w tym zakresie pozwolą na uzyskanie najbardziej wydajnych izolatów i umożliwią ich wykorzystanie do rozkładu celulozy w środowisku przyrodniczym, jak i odpadów przemysłowych. Wpisuje się to w szereg strategii dotyczących ochrony środowiska i zrównoważonego rozwoju w skali kraju, Europy i świata.

3. Ocena formalna i merytoryczna rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgra inż. Jakuba Dobrzyńskiego została przygotowana w formie spójnego tematycznie zbioru trzech artykułów opublikowanych w latach 2021 - 2023.

Rozprawa doktorska składa się z dwóch części. Pierwsza część, o objętości 38 stron prezentuje syntezę wyników badań z zakresu oceny wpływu płodozmianu, monokultury oraz nawożenia obornikiem bydlęcym na występowanie, skład i różnorodność przetrwalnikujących bakterii celuloitycznych (WBPBC) w glebie uprawnej. Obejmuje następujące rozdziały: spis treści, streszczenie pracy w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, wprowadzenie, spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, problematykę, cel i hipotezę badawczą, schemat doświadczenia, wybór metody badawczej pozwalającej na określenie występowania WBPBC w glebie rolniczej – konkluzje z publikacji nr 1, metody badawcze wykorzystane w pracy doktorskiej, reakcję celuloitycznych i potencjalnie celuloitycznych bakterii przetrwalnikujących na różne rodzaje upraw i nawożenie obornikiem w glebie – wyniki i dyskusja publikacji nr 2, właściwości celuloityczne *Bacillus* sp. 8E1A wyizolowanego z gleby pozaryzosferowej – wyniki i dyskusja publikacji nr 3, wnioski, bibliografia.

Druga część manuskryptu w formie Aneksu jest dokumentacją rozprawy doktorskiej i zawiera kopie trzech opublikowanych monotematycznych oryginalnych prac naukowych, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej:

- 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>

Za szczególnie cenne uważam kompleksowe i merytoryczne wprowadzenie w temat dysertacji, wskazanie luk w obecnym stanie wiedzy, wymagających uzupełnienia

oraz selektywne przedstawienie najważniejszych wątków z zakresu wyników przeprowadzonych badań własnych i ich dyskusji z literaturą prezentowanego w pracy zagadnienia. Bibliografia obejmuje 93 właściwie wyselekcjonowanych pozycji literatury, niezbędnych do wykorzystania w części pierwszej dysertacji. Stanowi kompendium wiedzy na temat występowania względnie beztlenowych przetrwalnikujących bakterii celulolitycznych w glebie użytkowanej rolniczo.

Hipoteza badawcza została sformułowana umiejętnie, a główne i szczegółowe cele badawcze są jasno określone. Doktorant przedstawił 6 zwięzłych wniosków, które znajdują potwierdzenie w wynikach uzyskanych w trakcie realizacji badań. Stanowią one merytoryczne i syntetyczne podsumowanie, potwierdzające osiągnięcie wyznaczonych celów badawczych, dających również podstawy do kontynuacji badań w przyszłości.

Zwraca uwagę brak oświadczeń współautorów załączonych artykułów określających indywidualny udział każdego z autorów w powstanie danej publikacji. Jednak z informacji zawartych w załączonych artykułach wynika, że mgr inż. Jakub Dobrzański odgrywał dominującą rolę w opracowaniu koncepcji i metodyki badań, wykonaniu analiz laboratoryjnych, napisaniu maszynopisu oraz odpowiedzi na recenzje. Należy zaznaczyć, że Doktorant jest pierwszym autorem i jednocześnie autorem korespondencyjnym we wszystkich załączonych artykułach.

W świetle przedstawionych danych, dobór artykułów naukowych w taki sposób aby tworzyły rozprawę doktorską nie budzi moich zastrzeżeń. Dobór cytowanych prac do poruszanych aspektów merytorycznych pracy doktorskiej uznaję za odpowiedni i poprawny. Prace stanowiące rozprawę, przed opublikowaniem w wydawnictwach naukowych, podlegały wnikliwym i rygorystycznym recenzjom (peer-review) wykonanych przez specjalistów i edytorów naukowych. Artykuły uzyskały pozytywne opinie. Nie widzę zatem konieczności omawiania strony merytorycznej i edytorskiej tych prac w dalszej części mojej oceny.

Rozprawę doktorską stanowi kompilacja trzech spójnych tematycznie artykułów, opublikowanych w latach 2021 - 2023. Wszystkie artykuły zostały bardzo starannie przygotowane pod względem merytorycznym i formalnym. Manuskrypty zostały wydane w międzynarodowych czasopismach naukowych: Agriculture – 1 artykuł i Agronomy – 2 artykuły o sumarycznym współczynniku Impact Factor wynoszącym 11,25 i sumarycznej liczbie punktów 340 według listy czasopism punktowanych MNiSW, uwzględniając rok wydania.

Podstawą przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej było przeprowadzenie badań mikrobiologicznych w glebie pochodzącej z doświadczenia założonego w latach 1922-24 (jeden z najstarszych i nadal kontynuowanych nawozowych eksperymentów polowych w Europie) w Stacji Doświadczalnej Instytutu Rolnictwa SGGW im. prof. Mariana Górskiego w Skierniewicach.

W próbkach gleby pobranych z poszczególnych wariantów doświadczenia, oznaczono podstawowe jej parametry fizykochemiczne oraz mikrobiologiczne prawidłowo dobranymi metodami i technikami stosowanymi w tym zakresie.

Zastosowane przez Doktoranta podejście analityczne do oceny zróżnicowania i aktywności celulolitycznej badanych populacji bakterii, należących do typu Firmicutes w glebie pobranej w różnych systemach uprawy i płodozmianie są nowatorskie, kompleksowe i atrakcyjne z punktu widzenia wiedzy podstawowej i badań aplikacyjnych.

Pierwsza praca (Dobrzyński i in., 2023, Agriculture 13, 1979) z cyklu składającego się na ocenianą dysertację ma charakter przeglądowy i oparta jest na 161 pozycjach literaturowych. Przedstawiono w niej problemy związane z taksonomią bakterii z rodzaju *Bacillus* i pokrewnych rodzajów należących do typu Firmicutes oraz ich ekologię i właściwościami celulolitycznymi. Podkreślono, że w określonych warunkach odnośnie wartości temperatury i pH, bakterie te zwiększają lub obniżają tempo rozkładu celulozy w glebie zawartej m.in. w resztkach poźniwnych i oborniku, a także w ograniczeniu odpadów przemysłowych bogatych w celulozę. Opisano i zweryfikowano metody i techniki oceny liczebności i zróżnicowania populacji tej grupy bakterii. Wskazano metodę sekwencjonowania genów hiperzmiennego regionu V4 w genach 16S tRNA z użyciem sekwenatora nowej generacji MiSeq (Illumina) jako najbardziej efektywną do analizy wybranej grupy drobnoustrojów w przeprowadzonych badaniach.

W drugiej z prac składających się na dysertację (Dobrzyński i in., 2021, Agronomy 11, 772) badano jak rodzaj płodozmienu i nawożenie obornikiem bydlęcym wpływa na zróżnicowanie i aktywność WBPBC w badanych glebach. Wykazano, że długotrwałe nawożenie obornikiem bydlęcym spowodowało wzrost ilości N i C w glebie, co doprowadziło do wzrostu NPL badanych bakterii - w wyniku sekwencjonowania hodowli WBPBC, we wszystkich próbkach około 100% OTU zostało przypisanych do typu Firmicutes. Stwierdzono, że konieczne są dalsze badania, mające na celu ustalenie korelacji między właściwościami fizykochemicznymi gleby a relatywną obfitością mikroorganizmów typu Firmicutes. Analiza PCoA pokazała, że nawożenie obornikiem w porównaniu do stosowanego zmianowania roślin było silniejszym czynnikiem modyfikującym

społeczności bakteryjne w analizowanych próbkach gleby, na co wskazują znaczne różnice między społecznościami WBPBC w glebach z lub bez nawożenia obornikiem, co można tłumaczyć obecnością celulozy w słomie obornikowej, która mogła wpłynąć na zwiększenie liczebności tych bakterii. W artykule wykorzystano 68 pozycji literaturowych.

W trzecim manuskrypcie (Dobrzyński i in., 2022, *Agronomy* 12, 665) przedstawiono wyniki badań własnych dotyczące izolacji kilkudziesięciu szczepów WBPBC z gleby pochodzącej ze 100 letniego doświadczenia polowego oraz oznaczenia właściwości celulolitycznych wybranego izolatu celem potwierdzenia występowania hodowalnych WBPBC oraz określenia ich przydatności do potencjalnego wykorzystania w rolnictwie i przemyśle np. do utylizacji odpadów lignocelulozowych. Stwierdzono, że badany izolat — *Bacillus* sp. 8E1A — był w stanie wyprodukować wszystkie badane enzymy rozkładające celulozę na każdym z substratów stosowanych w hodowli. Szeroki zakres optymalnych wartości temperatury i pH sugerują, że celulazy wytwarzane przez *Bacillus* sp. 8E1A mają potencjał do wykorzystania również poza rolnictwem. W artykule wykorzystano 53 pozycji literaturowych.

Należy podkreślić duży nakład pracy i zaangażowanie Doktoranta w przygotowanie wskazanych artykułów naukowych, stanowiących oceniane osiągnięcie. Duża wiedza i znajomość badanego zagadnienia widoczne były zwłaszcza w artykule przeglądowym (nr 1), jak i części eksperymentalnej, interpretacji wyników i opracowaniu statystycznym wyników badań własnych zamieszczonych w artykule nr 2 i 3. Współtworzenie badań naukowych i artykuły wieloautorskie wskazują na umiejętność pracy w zespole oraz gotowość wymiany wiedzy i wzajemnego uzupełniania swoich kompetencji.

Z obowiązku recenzenta muszę wskazać na pewne uchybienia i niejasności:

1. Błędy stylistyczne i językowe zauważone w recenzowanej pracy mają charakter dość nieprecyzyjnych określeń, które utrudniają zrozumienie przedstawianych treści, np.
 - „różne praktyki zarządzania glebami” (s. 12),
 - „badanie to jest wyjątkową okazją do zbadania...” (s.12),
 - „...społeczność WBPBC w glebie po tak długim okresie użytkowania” (s.13),
 - „...unijnej strategii ochrony gleby na 2030 rok” (s.13),
 - „pastwiska obsiane pszenicą” (s.18),
 - „zaobserwowano w próbce ARP-FYM” (s.19),
 - „nie zgłosili różnic w różnorodności...w glebie z dwóch różnych płodozmianów...” (s.19),
 - „...tzw zdrowie gleby wynikające ze stosowania zmianowania roślin” (s.20),

- „w niniejszym badaniu wyizolowano...” (s.24).

W związku z tym proszę o wyjaśnienie przytaczanych pojęć „zarządzanie glebami” i „zdrowie gleby”.

2. Układ pracy jest dosyć oryginalny i niekonwencjonalny. Proponowałbym wprowadzić klasyczne rozdziały dla dysertacji doktorskiej, zwłaszcza: Materiał i metody badań oraz Wyniki badań i dyskusja z adekwatnymi tytułami podrozdziałów obejmujących zamieszczone treści. Wpłynęłoby to na ich przejrzystość i lepszy odbiór u czytelnika.
3. Proszę podać właściwą nazwę Stacji Doświadczalnej w Skierniewicach, gdzie prowadzone było doświadczenie polowe? Jakie były założenia statystyczne tego doświadczenia?
4. W rozdziale Metody badawcze wykorzystane w pracy doktorskiej – należy podać źródła literaturowe wymienionych metod oraz uporządkować formę ich prezentacji (np. w punktach), co zwiększy czytelność tego rozdziału.
5. Co wpłynęło na pobór próbek gleby przy wskazanej roślinie w płodozmianie? (tabela 1) W jakim terminie dokonano ich poboru?
6. Powoływanie się na tabele i wykresy z załączonych artykułów (s. 18, 19, 20, 21, 25, 26, 27) jest niewystarczające, według mnie w tekście powinny być one zamieszczone, tak jak tabela 1 (s.14)
7. W rozdziale 7 i 8 można było przedstawić dokładniej analizę statystyczną uzyskanych wyników badań.

Zauważyłem również, że jedna praca zamieszczona w rozdziale Bibliografia nie została zacytowana w tekście pracy (Kamli, M.R.; Alzahrani, N.A.Y.; Hajrah, N.H.; Sabir, J.S.M.; Malik, A. Genome-Driven Discovery of Enzymes with Industrial Implications from the Genus *Aneurinibacillus*. *Microorganisms*. 2021, 9, 499), a jednej pracy cytowanej na str. 8 (Liu i wsp. 2021) nie ma w Bibliografii.

Należy zwrócić także uwagę na sekwencję cytowań pozycji bibliograficznych w tekście pracy w przypadku kilku prac (str. 12, 20, 21, 22, 25) – według mnie powinno być od najstarszego do najnowszego roku opublikowania cytowanej pracy.

Wymienione uwagi nie obniżają wartości naukowej pracy, mają często charakter dyskusyjny, redakcyjny i techniczny.

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że treść pracy i przeprowadzone badania są oryginalne i pogłębiają dotychczasową wiedzę z zakresu oceny wpływu płodozmiaru,

monokultury oraz nawożenia obornikiem bydlęcym na występowanie i różnorodność przetrwalnikujących bakterii celullolitycznych (WBPBC) w glebie uprawnej oraz izolowania i oceny aktywności enzymatycznej bakterii z rodzaju Bacillus w środowisku glebowym i odpadach przemysłowych przy rozkładzie celulozy. Poruszane w niej zagadnienia są ważne i uzasadnione zarówno pod względem poznawczym, jak i użytkowym. Uzyskane oryginalne wyniki mają duże znaczenie poznawcze i aplikacyjne. W mojej ocenie Kandydat na stopień naukowy doktora wykazał się dobrą znajomością podjętej problematyki badawczej i wysoką umiejętnością interpretacji wyników badań eksperymentalnych. Co ważne, wyniki uzyskane w ramach rozprawy doktorskiej stanowią mogą podstawę do dalszych badań w tym zakresie. Daje to również nadzieję na dalszy rozwój naukowy Doktoranta.

4. Wniosek końcowy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgra Jakuba Dobrzyńskiego pt.: **„Występowanie względnie beztlenowych, przetrwalnikujących bakterii celullolitycznych w glebie różnie użytkowanej rolniczo”**, zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789) oraz Ustawą z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 z późniejszymi zmianami) - art. 187, odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim. Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w dziedzinie nauki rolniczej i ważny wkład w rozwój dyscypliny naukowej rolnictwo i ogrodnictwo.

Wnioskuje do Rady Naukowej ITP – PIB w Falentach o przyjęcie niniejszej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgra Jakuba Dobrzyńskiego do kolejnych etapów postępowania doktorskiego.

Siedlce, 31 maja 2024 rok



dr hab. inż. Krzysztof Pakuła, profesor uczelni