



UNIwersytet
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

Toruń, 23.05.2024

Dr hab. Agnieszka Kalwasińska, prof. UMK
Katedra Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgra Wojciecha Sokołowskiego

pt.: **Ocena zdolności endofitów bakteryjnych z rodzajów *Methylobacterium* i *Micromonospora* do realizacji mechanizmów promujących wzrost roślin *in vitro* oraz *in planta***

Przedłożona do oceny praca doktorska Pana mgra Wojciecha Sokołowskiego została wykonana w Katedrze Genetyki i Mikrobiologii Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej pod kierunkiem dr hab. Sylwii Wdowiak-Wróbel, prof. UMCS jako promotora oraz dr Monika Marek-Kozaczuk jako promotora pomocniczego.

1. Uwagi ogólne i znaczenie podjętej tematyki badań

Problematyka badawcza omawianej rozprawy doktorskiej dotyczy aktualnej tematyki promowania wzrostu roślin przez bakterie.

Bakterie wspomagające wzrost roślin to korzystne mikroorganizmy, które bytują w glebie w pobliżu systemu korzeniowego roślin, na powierzchni korzeni, a także wewnątrz ich tkanek. W obliczu globalnych wyzwań związanych ze zmianami klimatycznymi i produkcją żywności, coraz większy nacisk kładzie się na zrównoważone praktyki rolnicze. Bakterie endofityczne, które żyją wewnątrz roślin, mogą zwiększać plony i poprawiać zdrowie roślin bez konieczności stosowania chemicznych nawozów i pestycydów. Dzięki naturalnym mechanizmom, takim jak wiązanie azotu, produkcja fitohormonów, rozpuszczanie trudno przyswajalnych związków fosforu oraz indukcja odporności, endofity mogą wspierać rozwój roślin w sposób przyjazny dla środowiska.



Praktyczne zastosowanie bakterii promujących wzrost roślin napotyka wiele wyzwań biologicznych, technologicznych i ekonomicznych. Naturalna konkurencja między mikroorganizmami w glebie utrudnia kolonizację przez wprowadzone bakterie. Laboratoria oferują kontrolowane warunki, podczas gdy gleba jest środowiskiem zróżnicowanym i heterogenicznym, co wymaga adaptacji bakterii. Skuteczność zależy od fazy wzrostu rośliny, co wymaga precyzyjnego zarządzania aplikacją. Wprowadzenie bakterii do gleby wymaga odpowiednich metod, takich jak mieszanie z glebą, zaprawianie nasion czy opryskiwanie, z których każda ma swoje ograniczenia. Opracowanie bakteryjnego preparatu promującego wzrost roślin jest więc złożonym i pracochłonnym procesem, a nie wszystkie próby kończą się sukcesem. Dlatego uważam, że badania dotyczące poszukiwania nowych, obiecujących biotechnologicznie szczepów bakteryjnych, analizy ich informacji genetycznej oraz badania właściwości fizjologiczno-biochemicznych pod kątem konkretnego potencjału użytkowego, a także próby ich aplikacji, są bardzo cenne i potrzebne w nauce. Stanowią one istotny element biologizacji rolnictwa. Tematyka pracy doktorskiej mgr Wojciecha Sokołowskiego doskonale wpisuje się w ten nurt.

2. Ocena formalna rozprawy doktorskiej

Układ pracy jest typowy dla prac doktorskich i zawiera następujące rozdziały: Wstęp, poprzedzony Spisem treści, Hipoteza i cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i wnioski, Bibliografia oraz Aneks. W Aneksie przedstawiono informacje o edukacji, zainteresowaniach naukowych, publikacjach, których doktorant jest współautorem, uczestnictwie w konferencjach naukowych, innych aktywnościach naukowych oraz działalności popularyzatorskiej, nagrodach i wyróżnieniach, a także umiejętnościach specjalistycznych. Praca liczy 263 strony i została napisana bardzo starannie, z dbałością o wszelkie szczegóły, językiem i stylem, który jest precyzyjny, klarowny oraz rzeczowy. Autor wykorzystał 389 pozycji piśmiennictwa dobrane właściwie pod względem tematycznym.

3. Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Tytuł zaprezentowanej rozprawy doktorskiej adekwatnie odzwierciedla jej treść, a uzyskane wyniki są zgodne z wyznaczonym celem badań.



Pierwszy rozdział pracy doktorskiej, zatytułowany "Wstęp," zawiera zwięzły przegląd literatury dotyczącej omawianego tematu. Jest logicznie uporządkowany i spójny, dostarczając kluczowych informacji niezbędnych do zrozumienia celu badań oraz interpretacji uzyskanych wyników.

Hipoteza oraz cele badawcze zostały sformułowane precyzyjnie, łącząc aspekt poznawczy i aplikacyjny. Aspekt poznawczy dotyczy identyfikacji izolatów bakteryjnych pozyskanych z brodawek roślin z rodziny *Fabaceae*, ich charakterystyki genetycznej oraz fizjologiczno-biochemicznej w kontekście potencjału biotechnologicznego związanego z promowaniem wzrostu roślin. Aspekt aplikacyjny natomiast odnosi się do realizacji mechanizmów promujących wzrost roślin *in vitro* oraz *in planta*.

Kolejny rozdział rozprawy obejmuje opis materiałów oraz metod badawczych wykorzystanych w pracach eksperymentalnych. Rozdział ten jest podzielony na podrozdziały odpowiadające strukturze kolejnego rozdziału "Wyniki," co znacząco poprawia czytelność pracy i ułatwia analizę danych. Zastosowane metody są właściwe, wyczerpujące i pozwalają na weryfikację postawionych hipotez. Na uwagę zasługuje szeroki wachlarz zastosowanych metod, obejmujący zarówno metody hodowlane, biochemiczne (np. wykorzystanie testów BIOLOG), jak i molekularne (wielolokusowa analiza sekwencji MLSA, sekwencjonowanie amplikonów genu 16S rRNA, sekwencjonowanie amplikonów genów związanych z promowaniem wzrostu roślin). Opis metod jest klarowny i precyzyjny.

Do tej części rozprawy doktorskiej mam kilka drobnych uwag:

- Str. 59. Należałoby podać moc i odczyn opisywanych buforów.
- Str. 61. Należałoby podać źródła literaturowe dotyczące zastosowanych primerów dla *gyrB*, *rpoB*, *atpD*, *nifH*; dla wszystkich par starterów podać długość produktu PCR.
- Str. 62. Należałoby podać stężenia odczynników oraz ich źródła (nazwa firmy).
- Str. 76. Należałoby opisać, w jaki sposób zliczano komórki (wykorzystanie zestawu LIVE/DEAD), czy np. wykorzystywano jakieś oprogramowanie w tym celu, w ilu polach widzenia zliczano?



- Str. 83. Należałoby rozwinąć informację dotyczącą „morfologii typowych bakterii ryzobiowych”, podając w nawiasie, o jakie cechy chodzi.
- Str. 86. Należałoby podać, w jaki sposób macerowano tkanki.

Kluczową część pracy stanowi rozdział wyniki. Opis wyników jest zazwyczaj precyzyjny i wyczerpujący. Wykresy i tabele przygotowane są bardzo starannie.

Do tej części rozprawy doktorskiej również mam kilka drobnych uwag:

- Do figur prezentowanych na stronach od 115-156 należałoby dodać informacje, czy występują istotne różnice w aktywnościach fizjologiczno-biochemicznych pomiędzy badanymi szczepami.
- Str. 152, Tabela 10 brakuje wyniku dodatniego dla wskazania zdolności wiązania azotu przez szczep *Methylobacterium* sp. Red Cyt.
- Str. 164, Fig. 65 jest błąd w oznaczeniu różnic istotnych statystycznie pomiędzy kontrolą a *Methylobacterium* sp. Red Cyt – z opisu wynika brak różnic, podczas gdy różnica jest istotna.
- Str. 193. Czy próbowano zastosować inne, niż opisane w pracy doktorskiej, pary primerów dla *nifH*?

Dyskusja jest napisana wnikliwie i zawiera wszystkie aspekty poruszone w wynikach. Moim zdaniem, rozdział ten mógłby być krótszy, gdyby zredukowano w nim opis wyników. Dzięki temu doktorant uniknąłby powtarzania informacji z poprzedniego rozdziału.

Kolejny rozdział, Podsumowanie wyników i wnioski, obejmuje syntetyczne ujęcie przeprowadzonych badań oraz najważniejszych wyników wraz z sugestiami dotyczącymi kolejnych badań, co jest istotne wobec zbyt obszernej dyskusji wyników.

Chciałabym zapytać doktoranta, które z uzyskanych wyników uważa za najbardziej obiecujące i wskazujące kierunek przyszłych badań, a które okazały się rozczarowujące, gdyż nie spełniły jego oczekiwań. Jakie mogą być przyczyny tych rozczarowań?



Podsumowując, przeprowadzone prace eksperymentalne prezentują oryginalne rozwiązanie postawionego problemu badawczego i dostarczają wielu istotnych informacji, które poszerzają wiedzę na temat bioróżnorodności i potencjału biotechnologicznego organizmów endofitycznych z rodzaju *Methylobacterium* i *Micromonospora*, i mają potencjał dla dalszych badań w tej dziedzinie. Stwierdzam, że Pan mgr Wojciech Sokołowski, mimo pewnych, drobnych niedociągnięć w opisie przeprowadzonych badań, uzyskał wiele cennych wyników poszerzających stan wiedzy w dyscyplinie nauki biologiczne.

Z informacji zawartych w Aneksie do rozprawy doktorskiej wynika, że Pan mgr Wojciech Sokołowski jest współautorem siedmiu artykułów naukowych, w tym trzech opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych z dziedziny biologii t.j International Journal of Molecular Sciences, Scientific Reports oraz Molecules oraz uczestniczył w wielu konferencjach naukowych (krajowych i międzynarodowych). Ponadto doktorant jest członkiem Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego, uczestniczył w wewnętrznym projekcie badawczym, a także prowadzi aktywną działalność popularyzatorską. Tego rodzaju działalność świadczy o motywacji, pasji oraz zaangażowaniu w dążenie do zdobycia stopnia naukowego doktora, a także pozytywnie rokuje na przyszłą karierę naukową.

4. Ocena końcowa

Podsumowując, oceniam rozprawę doktorską mgr Wojciecha Sokołowskiego pod tytułem „Ocena zdolności endofitów bakteryjnych z rodzajów *Methylobacterium* i *Micromonospora* do realizacji mechanizmów promujących wzrost roślin *in vitro* oraz *in planta*” jako spełniającą kryteria stawiane pracy doktorskiej określone w art. 187 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. 2018 poz. 1668 – tekst ujednolicony).

Pan Wojciech Sokołowski wykazał się teoretyczną i praktyczną wiedzę w zakresie mikrobiologii. Przedstawił szeroki zakres metod badawczych stosowanych w mikrobiologii oraz umiejętnie prezentował i interpretował wyniki swoich badań.



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

W świetle powyższych kwalifikacji, wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana Wojciecha Sokołowskiego do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Biorąc pod uwagę walory poznawcze i aplikacyjne oraz wysoki poziom merytoryczny stawiam wniosek o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

dr hab. Agnieszka Kalwasińska, prof. UMK

Toruń, 23.05.24

A. Kalwasińska