

Puławy, dn. 04.07.2024 r.

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

**Zakład Mikrobiologii Rolniczej**

## **RECENZJA**

**rozprawy doktorskiej mgra inż. Wojciecha Sokołowskiego**  
**pt. „Ocena zdolności endofitów bakteryjnych z rodzaju *Methylobacterium* i**  
***Micromonospora* do realizacji mechanizmów promujących wzrost roślin**  
***in vitro* oraz *in planta*”**

Przedłożona do oceny praca doktorska Pana mgra inż. Wojciecha Sokołowskiego została wykonana w Instytucie Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Rozprawa doktorska została przygotowana pod kierunkiem naukowym dr hab. Sylwii Wdowiak – Wróbel, profesora uczelni jako promotora oraz dr Moniki Marek-Kozaczuk jako promotora pomocniczego. Recenzję rozprawy doktorskiej przygotowano na prośbę Pani prof. dr hab. Anny Jarosz – Wilkołazka, Dyrektora Instytutu Nauk Biologicznych UMCS.

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

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgra inż. Wojciecha Sokołowskiego dotyczy bardzo aktualnej tematyki oceny różnorodności taksonomicznej i biotechnologicznej endofitów bakteryjnych z rodzaju *Methylobacterium* i *Micromonospora* z potencjalnym ich przeznaczeniem do promowania wzrostu i rozwój roślin. Doktorant podjął się trudnej ale bardzo interesującej kwestii poszukiwania nowych, ważnych biotechnologicznie oraz wysoce aktywnych metabolicznie szczepów bakteryjnych. Obecnie wiele zespołów naukowych poszukuje endofitów, w tym nowych źródeł izolacji bakterii oraz ich metabolitów o ciekawych strukturach i mechanizmach działania.

W niniejszej dysertacji na uwagę zasługuje także dobór roślin, z których wyizolowano endofity. Mowa tu o roślinach z rodziny bobowatych (*Fabaceae*) a mianowicie: koniczyny białej (rośliny pochodzące z Republiki Południowej Afryki oraz

Polski), koniczyny długokłosowej, szczodrzeńca zmiennego oraz soi warzywnej. Rośliny bobowate mają szczególne znaczenie w uprawie, głównie poprzez fakt, że są ważnym źródłem białka dla ludzi i zwierząt, a ich uprawa wpływa korzystnie na żyzność gleb i plonowanie innych roślin uprawianych w zmianowaniu, zwłaszcza w warunkach rolnictwa ekologicznego. W Polsce uprawia się różne gatunki roślin bobowatych, wśród których największe znaczenie gospodarcze mają groch siewny, soja, łubin żółty i bobik. Przeprowadzone przez Doktoranta badania nad zróżnicowaniem genetycznym i metabolicznym 26 szczepów bakterii endofitycznych wyizolowanych z brodawek korzeniowych roślin bobowatych wykazały duże zróżnicowanie oraz szereg cech biotechnologicznych co znajduje potwierdzenie w zastosowaniu tychże szczepów jako potencjalnych komponentów biopreparatów polepszających wzrost i rozwój roślin oraz preparatów do zastosowania w bioremediacji gleb. Tego typu badania mające na celu poszukiwanie nowych, ważnych biotechnologicznie szczepów w tym także endofitycznych są bardzo aktualne i cenne w nauce. W ten nurt doskonale wpisuje się tematyka pracy doktorskiej mgr inż. Wojciecha Sokołowskiego.

Udział endofitów w promowaniu wzrostu roślin oraz zwiększaniu zdrowotności i aktywności biologicznej gleb jest powszechnie znany, ponieważ to właśnie mikroorganizmy odgrywają główną rolę w mineralizacji materii organicznej, udostępnianiu roślinom składników pokarmowych, powstawaniu humusu glebowego, ograniczaniu patogenów i wielu innych. Ponadto niniejsza praca doktorska wpisuje się także w założenia tzw. Europejskiej Strategii Bioróżnorodności. W powyższym kontekście problematyka ocenianej pracy doktorskiej ma znaczenie użyteczne i praktyczne ze względu na możliwości potencjalnego wdrażania osiągniętych wyników badań do praktyki. Recenzowana rozprawa doktorska opiera się na bardzo szerokich analizach, w tym zarówno na laboratoryjnych metodach podstawowych jak i metodykach doświadczalnych z udziałem roślin. Warto podkreślić jest również to, że w recenzowanej dysertacji bardzo jasno i wysoce profesjonalnie przedstawiono wyniki badań będące efektem niezwykle rzetelnego poprowadzenia wszelkich oznaczeń oraz doświadczeń. Na szczególną uwagę zasługuje tutaj widoczna skrupulatność i sumienność Doktoranta w planowaniu i wykonaniu oznaczeń oraz opracowaniu wyników.

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

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

Opiniowana rozprawa doktorska ma postać monotematycznej dysertacji liczącej aż 263 strony, na których znajduje się: 11 tabel, 75 figur oraz 389 pozycji literaturowych (zarówno literatury polskojęzycznej jak i anglojęzycznej). Dysertacja składa się z klasycznych rozdziałów zgodnych ze schematem prac badawczych i nie budzących zastrzeżeń. Rozprawa zbudowana jest z 8 rozdziałów zasadniczych, do których zaliczam: „Wstęp”, czyli trzydziestostronicowy przegląd literatury dokonany w siedmiu głównych podrozdziałów. Kolejnym rozdziałem jest dwustronicowy rozdział „Hipoteza i cel pracy”, następnie „Materiały i metody”, „Wyniki”, „Dyskusja”, „Podsumowanie i wnioski”, „Bibliografia” oraz „Aneks”. Na wstępie dysertacji Doktorant dołączył również wykaz skrótów stosowanych w pracy oraz streszczenie pracy w języku polskim oraz streszczenie pracy w języku angielskim. Treść całej pracy doktorskiej została dodatkowo podzielna na liczne podrozdziały wyodrębnione w „Spisie treści”, co nadaje pracy dużą przejrzystość i czytelność.

W rozdziale „Wstęp” zostały bardzo jasno i syntetycznie przedstawione najważniejsze i aktualne informacje na temat roli i znaczenia bakterii endofitycznych ze zwróceniem szczególnej uwagi na bakterie z rodzaju *Methylobacterium* i *Micromonospora*. W tym także na mechanizmy promowania wzrostu roślin przez bakterie endofityczne oraz wykorzystanie endofitów w rolnictwie i ochronie środowiska. Doktorant opisuje także metody pozyskiwania efektywnych szczepów oraz przedstawia interakcje roślina-endofit zwracając także uwagę na mechanizmy kolonizacji wewnętrznych tkanek roślinnych przez te bakterie. Kolejny rozdział dysertacji to „Hipoteza i cel pracy”, w którym Doktorant przedstawia jasno i słusznie postawioną hipotezę badawczą. W celu jej weryfikacji stawia cztery poprawnie sformułowane cele badawcze, które konsekwentnie realizuje w toku prowadzonych badań. W mojej opinii cele badań oraz hipoteza badawcza zostały poprawnie zaplanowane a w toku realizacji badań Doktorant uzyskał wyniki dające na nie odpowiedź.

Weryfikację hipotezy badawczej oparto na powiązanych logicznie zaplanowanych, kolejnych etapach badań, adekwatnych do przyjętego celu rozprawy doktorskiej.

W czterdziestostronicowym rozdziale „Materiały i metody” Doktorant bardzo szczegółowo przedawnia i opisuje zarówno „Materiały” jak i „Metody”, które wybrał do badań. Należy podkreślić, że w opisie zarówno materiałów jak i metod Doktorant szczegółowo opisuje wszystkie metodyki, co pozwala na dosłowne odwzorowanie wszystkich prowadzonych przez Niego badań, przy zastosowaniu takich samych odczynników oraz metodyk. Jest to bardzo cenne w pracach badawczych. W części dotyczącej metodyk na uwagę i pochwałę zasługuje bardzo szeroki dobór stosowanych oznaczeń. Doktorant pokusił się o niezwykle szeroką i wielowątkową analizę badanych szczepów efektem czego jest pełna ich charakterystyka genetyczna i metaboliczna. Wśród zastosowanych metod można wymienić: detekcję i amplifikację genów rdzeniowych (*recA*, *gyrB*, *rpoB*, *atpD*), genu *mxoF* związanych ze zdolnością bakterii do realizowania mechanizmów promowania wzrostu roślin, wielolokusową analizę sekwencji genów rdzeniowych (MLSA), analizę fenotypową bakterii (testy Biolog, Microgen ID, API ZYM) oraz określenie tolerancji bakterii na różne czynniki biotyczne i abiotyczne, w tym określenie wzrostu bakterii pod kątem zróżnicowanego zakres odczynu, temperatury, stężenia soli czy też hamowania wzrostu patogenów. Doktorant dobrał także szczegółowe metodyki do oznaczeń zdolności badanych szczepów do produkcji substancji wzrostowych, hormonów czy enzymów. Określił także tolerancję badanych szczepów wobec wybranych pierwiastków (arsen, glin, miedź) a także ocenę zdolności bakterii do rozkładu węglowodorów zawartych w oleju napędowym.

Proszę w tym miejscu o wyjaśnienie dlaczego zostały wybrane do badań właśnie te trzy pierwiastki? Doktorant wykonał także analizy z udziałem roślin inokulowanych badanymi bakteriami, co znacząco wzbogaciło całą pracę i potwierdziło praktyczny aspekt prowadzonych badań. Wszystkie otrzymane wyniki badań zostały także poprawnie opracowane statystycznie. Proszę o odpowiedź jakie według Pana najważniejsze cechy powinien posiadać szczep będący komponentem bioproduktu do wspomaganie wzrostu roślin? Czy według Pana wiedzy szczepy z rodzaju *Methylobacterium* i *Micromonospora* są dostępne na rynku jako komponenty biopreparatów i czy ewentualnie mogą być także dedykowane roślinom bobowatym w koinolucji z bakteriami z rodzaju *Rhizobium*?

Najobszerniejsza część dysertacji stanowi rozdział „Wyniki”, w którym Doktorant precyzyjnie i szczegółowo omawia otrzymane dane zestawiając je w formie licznych figur i tabel. Forma prezentacji wyników oraz ich opis nie budzi zastrzeżeń. W jasny i logiczny sposób pozwala czytelnikowi na ich interpretację. W rozdziale „Wyniki” Doktorant opisuje w sposób syntetyczny rezultaty badań, które zostały bardzo dobrze uzasadnione i porównane z danymi z literatury. Opis wyników podkreśla spójność całej dysertacji. Kolejny rozdział rozprawy stanowi „Podsumowanie i wnioski”, w którym Doktorant sformułował osiem wniosków odpowiadających na cel badań. Niemniej jednak w mojej opinii wszystkie wnioski powinny stanowić bardziej „oznajmiający charakter”, stąd sugerowałabym zmianę stwierdzenia „szczepy charakteryzują się” na „szczepy posiadają zdolność/mają zdolność do”, np. przedstawiony wniosek nr 2 „*Wszystkie badane szczepy bakteryjne charakteryzują się zdolnością do realizowania różnych mechanizmów promowania wzrostu roślin in vitro*”, lepiej by wybrzmiał w sformułowaniu „*Badane szczepy bakteryjne posiadały zdolność do promowania wzrostu roślin in vitro*”.

Na końcu pracy znajduje się starannie przygotowany spis literatury obejmujący najważniejsze i trafnie dobrane pozycje literaturowe z zakresu przedmiotu badań. Na pochwałę zasługują bardzo dobrze i niezwykle licznie dobrana literatura dotyczące prezentowanej tematyki. Doktorant zacytował w dysertacji aż 389 pozycji literaturowych.

Podsumowując 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. Recenzowana rozprawa doktorska jest napisana językiem poprawnym stylistycznie, pozwalającym w łatwy sposób na dokładne śledzenie toku prowadzonych badań i rozwiązań naukowych. Z drobnych uwag nie wpływających na ogólną ocenę pracy proponowałabym rozdzielenie prezentowanych figur na dwie grupy: figury (jako wykresy i ryciny) oraz fotografie.

Konkludując ocenę merytoryczną rozprawy doktorskiej stwierdzam, że całość dysertacji powstała na podbudowie bardzo dobrej koncepcji badań.. Wszystkie badania zostały wykonane poprawnie pod względem metodycznym. Wyniki badań są oryginalne. Zostały one poprawnie opracowane statystycznie i dobrze zilustrowane. Wnoszą nowe wartości do dziedziny nauk ścisłych i przyrodniczych oraz nauk biologicznych i

mikrobiologicznych. Doktorant udowodnił, że posiada szeroką wiedzę teoretyczną do właściwej oceny otrzymanych wyników badań. Pan mgr inż. Wojciech Sokołowski udowodnił także, że posiada umiejętność syntetycznego opisywania problematyki badawczej zaprezentowanej w dysertacji, którą zatytułował „Ocena zdolności endofitów bakteryjnych z rodzaju *Methylobacterium* i *Micromonospora* do realizacji mechanizmów promujących wzrost roślin *in vitro* oraz *in planta*”.

### 3. Wniosek końcowy

Podsumowując prezentowana rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wykazuje szeroką wiedzę teoretyczną Doktoranta. Jednocześnie stanowi **niezwykle kompleksowe i praktyczne opracowanie** dotyczące określenia biotechnologicznego potencjału endofitów bakteryjnych z rodzaju *Methylobacterium* i *Micromonospora* do promowania wzrostu i ochrony roślin. Doktorant udowodnił, iż posiada szeroką 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. Wykorzystany przez Doktoranta 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 bardzo dobrze przemyślany plan badań i szeroki dobór odpowiednich metod badawczych, w tym także nowoczesnych metod badawczych z zakresu biologii molekularnej i oceny różnicowania metabolicznego bakterii.

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 Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Pana mgra inż. Wojciecha Sokołowskiego do kolejnych etapów postępowania doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na duże walory poznawcze i aplikacyjne otrzymanych wyników badań oraz zwracając szczególną uwagę na aktualność i trafność problematyki badawczej oraz wyróżniający się poziom merytoryczny pracy wykonanej przy zastosowaniu



nowoczesnych metod i narzędzi badawczych, wnoszę wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej Pana mgra inż. Wojciecha Sokołowskiego stosowną nagrodą.

A handwritten signature in blue ink, reading "Anna Gałązka". Below the signature, the text "dr hab. Anna Gałązka, prof. IUNG-PIB" is printed in a black, sans-serif font.

*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](mailto:agalazka@iung.pulawy.pl)