

Lublin, 21.06.2024 r.

Dr hab. Ewa Król, prof. uczelni
Katedra Ochrony Roślin
Zakład Fitopatologii i Mykologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OKK.616.3.2024

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Wojciecha Sokołowskiego

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

Pracę wykonano w Instytucie Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie pod kierunkiem naukowym dr hab. Sylwii Wdowiak-Wróbel, profesor uczelni oraz promotora pomocniczego dr Moniki Marek-Kozaczuk.

Uzasadnienie wykonania recenzji

Podstawą wykonania recenzji jest pismo Dyrektora Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej prof. dr hab. Anny Jarosz-Wilkołazkiej z dnia 25.04.2024 r., w którym zwróciła się w imieniu Rady Naukowej Instytutu o zrecenzowanie w/w pracy doktorskiej.

Zasadność podjęcia tematu pracy doktorskiej

Wprowadzana na terenie Unii Europejskiej, w ramach Europejskiego Zielonego Ładu, proekologiczna przebudowa gospodarki i związane z tym ograniczenia w zakresie używania preparatów chemicznych sprawiają, że maleje liczba pestycydów zarejestrowanych do stosowania w uprawach różnych gatunków roślin. Może to doprowadzić do problemów z prawidłową rotacją preparatów z różnych grup chemicznych i skutkować wzrostem odporności w populacjach agrofagów. Z tego powodu w ostatnich latach poszukuje się preparatów alternatywnych dla środków chemicznych, a jednocześnie bezpiecznych dla środowiska i zdrowia człowieka. Taką alternatywą dla agrochemikaliów może być stosowanie

biopreparatów wykorzystujących endofityczne bakterie lub ich metabolity, które posiadają wiele cech promujących wzrost i rozwój roślin, co z kolei przekłada się na wielkość i jakość plonu.

Biorąc pod uwagę powyższe informacje oraz fakt, że rośliny uprawne powinny być wolne od pozostałości pestycydów i całkowicie bezpieczne dla konsumentów, problematyka badań podjętych przez Doktoranta jest bardzo aktualna, wpisuje się w proekologiczną strategię rozwoju gospodarczego oraz odpowiada zarówno na potrzeby nauki jak i praktyki.

Charakterystyka pracy z podziałem na rozdziały

Przedstawiona do oceny rozprawa stanowi kompleksowe i kilkuwątkowe opracowanie badań nad oceną zdolności wybranych endofitów bakteryjnych do promowania wzrost roślin. Rozprawa ma powszechnie przyjęty i typowy układ dla tego typu opracowań. Obejmuje 263 strony, w tym 8 tabel, 75 figur i 9 stron aneksu. W różnych miejscach pracy Doktorant powołuje się na 389 pozycji literatury.

Podczas badań własnych, przeprowadzonych w warunkach *in vitro*, mgr inż. Wojciech Sokołowski skoncentrował się na izolacji bakterii endofitycznych z brodawek korzeniowych wybranych roślin z rodziny bobowatych (Fabaceae), klasyfikacji taksonomicznej pozyskanych izolatów oraz wielokierunkowej analizie zdolności badanych bakterii do realizowania mechanizmów związanych z promowaniem wzrostu roślin. W doświadczeniach *in planta* dokonał oceny skuteczności wytypowanych szczepów do promowania wzrostu wybranych roślin w różnych warunkach uprawy.

Opracowanie zawiera wszystkie formalnie wymagane dla rozprawy doktorskiej rozdziały, tzn. Spis treści, Wykaz skrótów stosowanych w pracy, Streszczenie i słowa kluczowe w językach polskim i angielskim, Wstęp, Hipotezę i Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie i Wnioski, Bibliografię oraz Aneks zawierający życiorys naukowy Doktoranta. W większości wymienionych rozdziałów Doktorant wydzielił podrozdziały, co jest bardzo trafne, bowiem przedstawione treści są usystematyzowane i przejrzyste.

Streszczenie zawiera syntetyczne omówienie celu i zakresu pracy, zastosowanych metod badawczych i otrzymanych wyników oraz najważniejsze wnioski uzyskane z przeprowadzonych doświadczeń.

We **Wstępie**, obejmującym 28 stron, Autor bardzo wnikliwie przeanalizował obszerną literaturę i w logiczny sposób przedstawił syntezę informacji naukowych, które bardzo dobrze wprowadzają w tematykę badań prezentowanych w dysertacji. W tej części pracy Doktorant

wydzielił 7 podrozdziałów poświęconych różnym aspektom prowadzonych badań. Na początku scharakteryzował mikrobiotę towarzyszącą roślinom, ze szczególnym uwzględnieniem bakterii endofitycznych i ich interakcji z rośliną oraz omówił kolonizację tkanek roślinnych przez bakterie. Następnie opisał mechanizmy promowania wzrostu roślin przez bakterie, metody pozyskiwania efektywnych szczepów bakterii endofitycznych oraz scharakteryzował rodzaje *Methylobacterium* i *Methylorubrum* oraz *Micromonospora*. Na szczególną uwagę zasługuje podrozdział poświęcony możliwości wykorzystywania endofitów w rolnictwie jako alternatywy do środków chemicznych, co wskazuje na aplikacyjny charakter prowadzonych przez Doktoranta badań i podkreśla znaczenie biologicznej ochrony roślin w aspekcie bezpieczeństwa dla ludzi i środowiska.

Całość tej części rozprawy doktorskiej wskazuje, że mgr inż. Wojciech Sokołowski posiada bardzo dobre rozeznanie w literaturze fachowej dotyczącej zagadnień związanych z tematyką Jego pracy doktorskiej. Wstęp jest wyczerpujący i bardzo dobrze napisany, a informacje w nim zawarte mogą być z powodzeniem wykorzystane do przygotowania wartościowej pracy przeglądowej.

Kolejny, obejmujący 3 strony rozdział „**Hipoteza i Cel pracy**” zawiera poprawnie postawioną hipotezę badawczą oraz 4 jasno sformułowane i opisane cele badawcze, służące jej weryfikacji.

W rozdziale „**Materiał i Metody**” Autor na 42 stronach zaprezentował materiał badawczy i zastosowane metody. W tym miejscu także wydzielił liczne podrozdziały odpowiadające poszczególnym celom badawczym, co przy tak szerokim zakresie prowadzonych doświadczeń porządkuje przedstawione treści i ułatwia ich analizę. Mgr inż. Wojciech Sokołowski bardzo dokładnie opisał sposoby przeprowadzania poszczególnych etapów badań, powołując się na dobrze dobrane, ogólnie przyjęte i stosowane metodyki badawcze.

W badaniach własnych Doktorant uwzględnił 26 izolatów bakterii wyselekcjonowanych spośród kultur wyizolowanych z brodawek korzeniowych 4 gatunków roślin z rodziny bobowatych. Osiemnaście z nich pochodziło z koniczyny białej zebranej w Republice Południowej Afryki, a pozostałe 8 izolatów uzyskano z roślin zebranych w Polsce południowo-wschodniej, przy czym 2 pochodziły z koniczyny białej, 1 z koniczyny długokłosowej, 3 ze szczodrzenia zmiennego, a 2 z soi warzywnej.

- W tym miejscu nasuwa się pytanie jaka była koncepcja włączenia do badań izolatów z RPA, czyli z tak odmiennych warunków klimatyczno-glebowych?

W kolejnych podrozdziałach Autor dokładnie opisał procedury izolacji bakterii endofitycznych z brodawek korzeniowych wybranych roślin, analizy genetyczne w celu określenia ich przynależności taksonomicznej, metodyki oceny wybranych cech biochemicznych bakterii, m.in. ocenę zdolności do wykorzystywania różnych źródeł węgla, wzrostu w różnych zakresach temperatury i na podłożach o zróżnicowanym pH oraz na podłożach zawierających zróżnicowane stężenie NaCl, a także jonów Cu, Al i As. Doktorant scharakteryzował także metody, które pozwoliły na ocenę zdolności bakterii do produkcji wybranych enzymów hydrolitycznych, do realizacji mechanizmów zaangażowanych w promocję wzrostu roślin, aktywnego ruchu, oddziaływań typu *quorum sensing*, tworzenia biofilmu, degradacji kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyowego (ACC) i wiązania azotu atmosferycznego, produkcji kwasu indylilo-3-octowego (IAA), indolu, metaloforów i HCN oraz rozkładu trifosforanów, celulozy i białek.

Szczególnie interesującym zagadnieniem było określenie zdolności badanych szczepów do rozkładu węglowodorów zawartych w oleju napędowym i przepracowanym oleju silnikowym jako jedyne źródła węgla i energii. Doktorant omówił także metody pozwalające na zbadanie potencjału szczepów do hamowania wzrostu wybranych fitopatogenów bakteryjnych i grzybowych oraz do indukcji kiełkowania nasion.

Na zakończenie tego rozdziału mgr inż. Wojciech Sokołowski przedstawił metodykę badań *in planta* w doświadczeniach szklarniowych i fitotronowych, gdzie Doktorant przebadał wpływ inokulacji roślin zawiesinami pojedynczych szczepów bakterii lub w kombinacji z bakteriami ryzobiowymi na wybrane cechy biometryczne roślin uprawianych w czystym substracie torfowym lub zanieczyszczonym jonami Cu, As oraz olejem napędowym.

Na uznanie zasługuje fakt, że poszczególne etapy badań zostały bardzo dobrze zaplanowane, a metody badawcze dokładnie opisane. Szeroki i interdyscyplinarny zakres badań oraz ich pracochłonność wskazują na duży nakład pracy włożony przez Doktoranta w przeprowadzenie opisanych doświadczeń oraz potrzebę opanowania różnych metod badawczych, które następnie umiejętnie zastosował w swojej pracy.

Po przeczytaniu tego rozdziału nasuwają się drobne wątpliwości, które powinny być doprecyzowane w trakcie przygotowywania publikacji naukowych do druku:

- Ile roślin uwzględniono w doświadczeniu szklarniowym (str. 83).
- Jakie było kryterium doboru gatunków roślin do badań w poszczególnych etapach doświadczeń roślinnych, bowiem w niektórych przypadkach uwzględniono 3 gatunki (koniczyna biała, pszenica zwyczajna, rzepak), a w innych 2 lub 1 gatunek.

- Które metodyki badań były autorskie, bowiem w niektórych podrozdziałach nie znalazłam odwołania do pozycji literatury, np. 3.2.5 – Analiza właściwości antagonistycznych bakterii endofitycznych, 3.2.6 – Doświadczenia roślinne (3.2.6.1; 3.2.6.4; 3.2.6.5; 3.2.6.6; 3.2.6.7; 3.2.6, 8; 3.2.6.9) oraz metodyki opisane w podrozdziałach 3.3.4.4; 3.3.4.6; 3.3.4.7; 3.3.4.12; 3.3.4.13; 3.3.4.15; 3.3.4.16 i 3.3.4.17.

Wyniki kompleksowych i pracochłonnych badań zostały szczegółowo omówione na 91 stronach i stanowią wnikliwą analizą uzyskanych danych. W rozdziale tym Autor wyodrębnił podrozdziały, odnoszące się do doświadczeń przeprowadzonych na poszczególnych etapach badań. Zamieścił także liczne i dobrze przygotowane figury, które ułatwiają studiowanie uzyskanych danych. Taki układ pozwolił na przejrzyste przedstawienie wyników, pomimo ich obfitości, a Doktorant wykazał się umiejętnością starannej dokumentacji oraz poprawnej interpretacji uzyskanych danych. Ponadto, wyniki doświadczeń roślinnych poddał analizie statystycznej, co podniosło ich wiarygodność oraz pozwoliło na precyzyjne określenie zależności między analizowanymi parametrami.

Bardzo ważnym aspektem pracy są wyniki badań dotyczących identyfikacji molekularnej badanych szczepów, gdzie wykorzystując sekwencjonowanie genu 16S rRNA, czterech genów rdzeniowych i bazy danych GenBank, Doktorant za pomocą algorytmu BLAST określił ich przynależność gatunkową. Pozwoliło to na zaklasyfikowanie badanych izolatów bakterii do rodzajów *Methylobacterium*, *Methylorubrum* i *Micromonospora*. Jednocześnie w ogólnopolskiej bazie danych GenBank zdeponowano fragmenty sekwencji genu 16S rRNA oraz genów rdzeniowych *recA*, *gyrB*, *rpoB* i *atpD* trzech szczepów z rodzaju *Methylobacterium*, pięciu z rodzaju *Methylorubrum* i dziewiętnastu z rodzaju *Micromonospora*. Jest to bardzo istotny wkład do nauki, bowiem udostępnienie sekwencji tych szczepów może w przyszłości okazać się pomocne w badaniach taksonomicznych prowadzonych przez innych badaczy, szczególnie w przypadku *Methylobacterium* i *Methylorubrum*, które wg danych literaturowych wymagają wypracowania nowych kryteriów umożliwiających prawidłowe przyporządkowanie gatunków.

Ważnym etapem badań była także detekcja w genomach badanych szczepów sekwencji genów związanych ze zdolnością bakterii do realizowania mechanizmów promowania wzrostu roślin (*mxoF*, *acdS*, *nifH*, *NRPS*, *PKS I*, *PKS II*). W przypadku szczepów charakteryzujących się obecnością genu/genów dokonano ich amplifikacji i sekwencjonowania, a uzyskane sekwencje zdeponowano w bazie GenBank.

Na uwagę zasługuje fakt, że mgr inż. Wojciech Sokołowski uwzględnił w badaniach zarówno ocenę mechanizmów promowania wzrostu roślin w warunkach *in vitro* jak i *in planta* z użyciem roślin rolniczych uprawianych na terenie Polski.

Doktorant wykazał, że wszystkie badane szczepy bakterii charakteryzowały się mniejszą lub większą zdolnością do realizowania różnych mechanizmów promowania wzrostu roślin. Niektóre z nich cechowały się potencjałem do hamowania wzrostu fitopatogenów, inne zdolnością do indukcji kiełkowania nasion lub promowania wzrostu roślin w warunkach uprawy w glebie zanieczyszczonej jonami metali ciężkich czy związków ropo pochodnych.

Autor wykazał, że było to możliwe m.in. dzięki zdolności większości badanych szczepów do produkowania różnych metabolitów chelatujących Fe, Cu, Al. i As, co z kolei wskazuje na możliwość wykorzystania wybranych szczepów w procesach fitoremediacji terenów skażonych substancjami ropo pochodnymi. Badania wrażliwości bakterii endofitycznych na niekorzystne warunki środowiska są uzasadnione i mają istotne znaczenie w aspekcie możliwości ich wykorzystania w uprawie oraz ochronie roślin. Wynika to z faktu, że szczepy zdolne do promowania wzrostu roślin powinny się także charakteryzować zdolnością do adaptacji w środowisku i odpornością na zmieniające się warunki fizykochemiczne. Za szczególnie obiecujące Doktorant uznał szczepy *Methylobacterium* sp. Red Mix I, *Micromonospora* sp. 5056, *Micromonospora* sp. N5, *Micromonospora* sp. 48, które w przyszłości mogą być użyte do produkcji biopreparatów wspomagających wzrost roślin.

Przedstawione wyniki pozwoliły na poszerzenie wiedzy na temat mechanizmów promowania wzrostu roślin przez bakterie endofityczne i wykazały, że Autor osiągnął zamierzone cele, zweryfikował postawioną hipotezę badawczą i uzyskał wiele cennych informacji dla nauki i praktyki.

Ważnym i bardzo interesującym rozdziałem recenzowanej pracy jest „Dyskusja”, która została przeprowadzona poprawnie, obejmuje 23 strony i świadczy o bardzo dobrej znajomości literatury dotyczącej problematyki pracy oraz o umiejętności wnikliwego analizowania wyników badań. Doktorant umiejętnie przedyskutował wyniki badań własnych z danymi literaturowymi. Dyskusja ma logiczny bieg, jest czytelna, spójna, przeprowadzona w sposób prawidłowy i rzetelny. Doktorant podjął w dyskusji wszystkie wątki zrealizowanych badań własnych konfrontując uzyskane wyniki z danymi dostępnymi w literaturze przedmiotu, co świadczy o Jego dużej wiedzy i dojrzałości. Na uwagę zasługuje

fakt, że Autor sprawnie posługuje się pojęciami dotyczącymi szeroko rozumianej mikrobiologii, analiz biochemicznych i technik biologii molekularnej.

Jednak w niektórych dyskutowanych wątkach pracy, mgr inż. Wojciech Sokołowski nie ustrzegł się częstego błędu polegającego na powtórzeniu w dyskusji informacji literaturowych lub wyników badań własnych omówionych we wcześniejszych rozdziałach.

W rozdziale „**Podsumowanie i wnioski**” Autor streścił wyniki badań własnych i przedstawił 8 **wniosków**, które w większości stanowią podsumowanie uzyskanych wyników i podkreślają najważniejsze dokonania wynikające z przeprowadzonych doświadczeń na każdym etapie badań.

Za najważniejsze osiągnięcia przedstawionej do oceny dysertacji doktorskiej uważam:

- aktualną tematykę badań i interdyscyplinarny charakter opracowania,
 - przeprowadzenie szerokiego zakresu badań laboratoryjnych, fitotronowych i szklarniowych w celu wszechstronnej oceny zdolności bakterii endofitycznych do realizacji mechanizmów promujących wzrost roślin,
 - kompleksowe i nowatorskie podejście do oceny mechanizmów promujących wzrost roślin,
 - skuteczną identyfikację badanych szczepów bakterii przy pomocy różnych technik molekularnych,
 - zdeponowanie nowych sekwencji nukleotydowych uzyskanych w trakcie badań własnych w bazie danych GenBank,
 - wskazanie szczepów bakterii efektywnych w promowaniu wzrostu rośliny gospodarza *in planta*, co daje nadzieję na ich wykorzystanie w przyszłości do produkcji preparatów biologicznych, użytecznych w rolnictwie lub w fitoremediacji terenów skażonych,
 - naukowy i aplikacyjny charakter przeprowadzonych badań.,
- Wśród wymienionych przez Autora wniosków, brakuje mi jednak krótkiej oceny i porównania zdolności do promowania wzrostu roślin przez szczepy bakterii pochodzących z roślin polskich i z RPA.
 - Jednocześnie, chciałabym prosić Doktoranta o wyrażenie opinii, czy mykobiota autochtoniczna może być konkurencją dla obcych szczepów bakterii endofitycznych, w aspekcie ich ewentualnego wykorzystania w rolnictwie na terenie naszego województwa /kraju?

Bibliografia w przedstawionej do oceny pracy doktorskiej liczy 389 pozycji, odpowiednio dobranych i powiązanych z tematyką pracy. Spośród nich ponad 98% stanowią prace w języku angielskim, a 32% to pozycje najnowsze, opublikowane w okresie 5

ostatnich lat. Spis pozycji literatury został przygotowany starannie, ale przy tak dużej liczbie cytowań nie udało się uniknąć niewielkich nieścisłości:

- W bibliografii brakuje pojedynczych publikacji wymienionych w tekście pracy, np. Mierzwa 2008 (str. 84), Tarabily i in. 2019 (str. 193), Koo i Cho 2007 (str. 195).
- Sposób cytowania pozycji wieloautorskich wymaga ujednolicenia. Zwykle Doktorant cytuje . nazwisko pierwszego autora z dopiskiem i in. Jednak pojawiają się cytowania z dopiskiem i wsp., dotyczy to zwłaszcza rozdziału „Dyskusja”, np. Canbolata i wsp. 2006 (str. 84), de Silva i wsp. 2013 oraz Khan i wsp. 2015 (str. 180), Kroppenstadt i wsp. 2005 (str. 185), Le i wsp. 2009 oraz Trotsenko i wsp. 2007 (str. 189), Kaewka i wsp. 2021 (str. 194) itd.
- W pracy znajdują się pojedyncze błędy dotyczące roku wydania cytowanej publikacji, np. w tekście pracy jest np. Ye i in. 2018 oraz Hu i in. 2019 (str. 188), natomiast w bibliografii cytowane są prace pierwszego autora z lat 2019 i 2023, a w przypadku drugiego z lat 2014 i 2020. Podobnie pozycja cytowana w tekście Wallace i wsp. 2023 (str. 191), widnieje w bibliografii jako artykuł z roku 2024.

Przedstawione drobne uwagi edytorskie w żaden sposób nie umniejszają wartości pracy i nie mają istotnego znaczenia dla mojej wysokiej oceny rozprawy doktorskiej mgr inż. Wojciecha Sokołowskiego.

Reasumując pragnę podkreślić, że przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi oryginalne i bardzo cenne rozwiązanie problemu naukowego, jest nowatorska i wskazuje nowe obszary do dalszych badań nad bakteriami endofitycznymi. Została napisana starannie, bardzo ładnym językiem, a uzyskane wyniki mają zarówno aspekt naukowy jak i praktyczny, co zdecydowanie podnosi ich wartość. Przygotowanie rozprawy wymagało dużego nakładu pracy Autora i zastosowania szerokiego warsztatu metodycznego.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Wojciecha Sokołowskiego spełnia wymagania ustawy o stopniach i tytule naukowym i kwalifikuje Doktoranta do ubiegania się o stopień naukowy doktora w dziedzinie nauki ścisłe i przyrodnicze w dyscyplinie nauki biologiczne. Na tej podstawie stawiam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Pana mgr inż. Wojciecha Sokołowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, z uwagi na bardzo szeroki zakres i wysoki poziom naukowy badań, ich wartość merytoryczną i aplikacyjną wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych o wyróżnienie przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.



Dr hab. Ewa Król, prof. uczelni