

Prof. dr hab. Ewa Solarska

Katedra Biotechnologii Mikrobiologii i Żywienia Człowieka

Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

ul. Skromna 8, 20-704 Lublin

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Pawła Trzcíńskiego pt. „Izolacja i selekcja bakterii glebowych wpływających na wzrost roślin truskawki (*Fragaria x ananassa* Duch.)”, wykonanej pod kierunkiem naukowym Prof. dr hab. Lidii Sas-Paszt w Zakładzie Mikrobiologii i Ryzosfery Instytutu Ogrodnictwa – Państwowego Instytutu Badawczego.

Recenzję wykonano realizując uchwałę Rady Naukowej Instytutu Ogrodnictwa - Państwowego Instytutu Badawczego w Skierniewicach podjętą w dniu 15 grudnia 2020 roku na podstawie maszynopisu pracy przesłanego przez Sekretarza Rady Naukowej dr Magdalenę Ptaszek.

Rynek środków biologicznych stale rośnie ze względu na zmieniające się przepisy i regulacje dotyczące rolnictwa, a w związku z tym obserwuje się zwiększony popyt na produkty biologiczne, co powoduje przechodzenie z konwencjonalnych systemów uprawy roślin na zrównoważone. Sytuacja ta wymusza konieczność poszukiwania nowych, innowacyjnych rozwiązań, w tym preparatów biologicznych. Dlatego też, nowe, naturalne środki produkcji rolniczej, które pozwolą złagodzić negatywny wpływ zmian klimatu na plonowanie roślin, czyniąc je bardziej odpornymi na stresy środowiskowe, stają się nieodzownym elementem współczesnego rolnictwa. Biostymulatory na bazie mikroorganizmów, cieszące się coraz większym zainteresowaniem wśród rolników, należą do produktów naturalnych poprawiających wzrost i funkcjonowanie roślin. Izolowanie mikroorganizmów z naturalnego środowiska wzrostu roślin oraz selekcja najefektywniejszych szczepów na podstawie określenia mechanizmów ich działania były możliwe dzięki wdrożeniu nowoczesnych metod izolacji, identyfikacji mikroorganizmów i oceny ich działania oraz metod badawczych dla doświadczeń nad wpływem pożytecznych mikroorganizmów na wzrost i plonowanie roślin ogrodniczych. Duże zasługi w zakresie zorganizowania dobrze wyposażonego laboratorium badawczego oraz opracowania i



doskonalenia tych metod i wprowadzania ich do praktyki ogrodniczej posiada zespół Pani Profesor Lidii Sas-Paszt. Istotny wkład w rozwój tych metod ma również Doktorant, mgr Paweł Trzciniński, którego badania bakterii glebowych wpływających na wzrost truskawki, wykonane w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej są nowatorskie i ważne dla nauki i praktyki ogrodniczej. Przedstawiona do recenzji praca doktorska poświęcona wymienionej tematyce to bardzo obszerne, poparte rzetelnymi badaniami opracowanie. Pod względem redakcyjnym wykonane jest ono starannie i obejmuje 148 stron. Praca ma budowę klasyczną, składa się ze streszczenia w języku polskim i angielskim, wstępu, celu badań, przeglądu piśmiennictwa, materiału i metod, wyników, dyskusji oraz wniosków. Bibliografia zawiera 188 pozycji dobrze dobrane i wykorzystanego piśmiennictwa. Wyniki zilustrowano 5 rysunkami, 3 fotografiami oraz 66 tabelami. We wstępie wyczerpująco uzasadniono potrzebę przeprowadzenia badań. Przegląd piśmiennictwa został zredagowany poprawnie, językiem zwięzłym i konkretnym i dowodzi pełnego rozeznania Doktoranta w wybranej tematyce badawczej. W tym rozdziale Autor bardzo obszernie przedstawił historię wykorzystania bakterii w stymulacji wzrostu roślin, wskazując że już w połowie ubiegłego wieku w niektórych krajach stosowano na szeroką skalę preparaty mikrobiologiczne, a obecnie na przykład w Chinach zarejestrowano do 2006 roku ponad 500 produktów mikrobiologicznych do stosowania w rolnictwie, w tym zawierających bakterie udostępniające roślinom fosfor i potas. W dalszej części przeglądu literatury Autor koncentruje się na opisie mechanizmów działania pożytecznych bakterii wymieniając bezpośrednio z nich, do których zalicza się udostępnianie składników pokarmowych i syntezę fitohormonów oraz pośrednio takie jak ochrona roślin przed szkodliwymi czynnikami środowiskowymi oraz wspomaganie kolonizacji korzeni przez arbuskularne grzyby mikoryzowe. W ostatnim podrozdziale przeglądu piśmiennictwa mgr Paweł Trzciniński zawarł informację o ograniczeniach zastosowania pożytecznych bakterii.

Zasadniczym celem badań, prezentowanych w niniejszej rozprawie doktorskiej było:

1. Utworzenie kolekcji bakterii o potencjalnie korzystnych cechach w stymulacji wzrostu wegetatywnego truskawki.
2. Selekcja bakterii o największym potencjale korzystnych cech.
3. Identyfikacja wyselekcjonowanych izolatów na podstawie analiz cech fenotypowych oraz sekwencji DNA.



4. Określenie wpływu wybranych izolatów bakterii na wzrost wegetatywny roślin truskawki odmian Elkat i Elsanta.

5. Poznanie potencjalnych cech wpływających na zwiększenie wzrostu wegetatywnego roślin truskawki.

Aby zrealizować cel Autor wykorzystał izolaty bakterii wyosobnionych w ciągu pięciu lat z ryzosfery i korzeni jabłoni, truskawki i wiśni rosnących na różnych typach gleb w różnych rejonach Polski o niskim zanieczyszczeniu środowiska. W badaniach bakterii zastosował wiele metod badawczych, opisanych szczegółowo i przejrzysto na 23 stronach maszynopisu w rozdziale „Materiał i metody”. Zostały one dobrze przemyślane, były adekwatne do założonego planu badań, wykonane rzetelnie, zgodnie z najlepszą sztuką laboratoryjną, z użyciem nowoczesnego sprzętu aparaturowego i są wystarczające do osiągnięcia zamierzonych celów badawczych. Należy podkreślić dużą staranność włożoną w pozyskanie materiału terenowego do badań laboratoryjnych. Ogółem pozyskano i detalicznie przebadano 581 izolatów bakterii. Na szczególną uwagę zasługuje fakt określania mechanizmów działania bakterii odpowiedzialnych za stymulację wzrostu wegetatywnego truskawki w warunkach symulujących warunki glebowe tj. przy normalnej koncentracji tlenu, w atmosferze beztlenowej i przy ograniczonej koncentracji tlenu. Ważnym elementem badań była ocena potencjału izolatów bakteryjnych do wytwarzania enzymów degradujących chitynę oraz metabolitów wtórnych toksycznych dla grzyba *Verticillium dahliae* również przy różnej koncentracji tlenu i jego braku. *Verticillium dahliae* jest groźnym patogenem truskawki i wzięcie pod uwagę zdolności bakterii do wytwarzania związków toksycznych dla tego grzyba oraz enzymów degradujących chitynę, świadczy o kompleksowym podejściu do badań oraz uwzględniającym specyfikę badanej rośliny. Autor dobrze opanował również zaawansowane techniki biologii molekularnej. Bowiem poza wykorzystaniem systemu Biolog (Biolog Inc.) do identyfikacji bakterii na podstawie cech fenotypowych Doktorant skoncentrował się głównie na identyfikacji tych mikroorganizmów na podstawie analizy sekwencji genów. Identyfikację bakterii przeprowadził na podstawie sekwencji genu kodującego podjednostkę 16S rRNA. Dla jednego ze szczepów identyfikację Autor przeprowadził dodatkowo na podstawie analizy sekwencji wielu loci. Dla wybranych szczepów Doktorant przeprowadził analizę filogenetyczną na podstawie sekwencji 16S rRNA. W ocenie wpływu wybranych szczepów bakterii na wzrost roślin truskawki zastosował bardzo precyzyjne metody badawcze z wykorzystaniem nowoczesnej aparatury pomiarowej. O kompleksowym podejściu do badań świadczy również uwzględnienie w badaniach oceny



stopnia kolonizacji korzeni przez arbuskularne grzyby mikoryzowe. Badania takie były możliwe do wykonania dzięki wyposażeniu laboratorium w specjalistyczny mikroskop fluorescencyjny z kontrastem i kamerą z oprogramowaniem. Na podkreślenie zasługuje również uporządkowane i czytelne przedstawienie przebiegu realizowanych zadań badawczych. Metody badawcze zastosowane przy realizacji rozprawy doktorskiej zostały dobrze dobrane i posłużyły do precyzyjnego wykonania postawionych celów badawczych.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej stosując oprogramowanie Statistica 13.1. Wyniki wpływu szczepów bakterii na cechy wzrostu wegetatywnego roślin oraz kolonizacji korzeni przez arbuskularne grzyby mikoryzowe zweryfikowano testem t-studenta. Wyboru szczepów o najkorzystniejszym wpływie na stymulację wzrostu roślin truskawki dokonano na podstawie testu Bonferroniego. Metody statystyczne wybrane przez autora są właściwe i wystarczające do opracowania i przedstawienia uzyskanych wyników.

Analiza uzyskanych wyników jest szczegółowa i uwzględnia wszystkie etapy badań oraz realizowane zadania. Do istotnych osiągnięć Doktoranta przedstawionych w wynikach, mających znaczenie naukowe oraz praktyczne, a wynikających z wykonanych badań zaliczam:

1. Określenie mechanizmów działania bakterii odpowiedzialnych za stymulację wzrostu wegetatywnego truskawki.
2. Wykazanie, że identyfikacja izolatów podobnych do kilku blisko spokrewnionych gatunków wymagała zastosowania kilku metod tj. analizy sekwencji genów metabolizmu podstawowego lub sekwencji genu 16S rRNA i analizy fenotypu oraz wskazanie, że analiza molekularna jest bardziej dokładna w porównaniu do analizy fenotypu.
3. Przeprowadzenie identyfikacji bakterii z wykorzystaniem różnych metod, która pozwoliła zaszeregować dwa najefektywniejsze szczepy w stymulacji wzrostu wegetatywnego roślin truskawki odmian Elkat i Elsanta typu frigo do gatunków *Erwinia bilingiae* i *Pseudomonas salomonii*, które nie były do tej pory wymieniane w literaturze jako stymulujące wzrost roślin.
4. Opracowanie charakterystyki molekularnej szczepów badanych bakterii na podstawie analizy filogenetycznej bazującej na sekwencji genów kodujących podjednostkę 16S rRNA
5. Opracowanie metodyki testowania wpływu bakterii na wzrost wegetatywny roślin truskawki z uwzględnieniem badania składu makro i mikroelementów w korzeniach i

liściach roślin oraz wpływu badanych bakterii na kolonizację korzeni roślin przez arbuskularne grzyby mikoryzowe.

W rozdziale Dyskusja Autor dokonał analizy uzyskanych wyników w konfrontacji z wynikami uzyskanymi przez innych autorów dowodząc zarówno dobrej znajomości badanej problematyki, jak i umiejętności weryfikacji wyników własnych badań z wynikami prezentowanymi w piśmiennictwie światowym. Najwięcej miejsca w dyskusji Doktorant poświęcił omówieniu identyfikacji wyizolowanych szczepów bakterii i dowiódł, że podobnie jak w przypadku innych autorów nie było możliwe prawidłowe określenie do gatunku żadnego szczepu z wykorzystaniem tylko jednej z użytych metod. Wszystkie aspekty uwzględnione w dyskusji świadczą o znajomości tematu i dojrzałości naukowej Autora.

Na zakończenie Autor przedstawia 8 w pełni uprawnionych wniosków dowodzących osiągnięcia zaplanowanego celu badań.

Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na pewne nieścisłości w pracy, które wymagają poprawy. I tak:

We wstępie zawarto następujące zdanie: "Z uwagi na dużą podatność aplikowanych mikroorganizmów na czynniki środowiskowe, promowane są metody oparte na zastosowaniu w produkcji roślin rodzimych mikroorganizmów, wyizolowanych z upraw i warunków glebowo-klimatycznych". Zdanie jest prawidłowe pod względem merytorycznym, ale tak skonstruowane wskazuje, że mikroorganizmy izoluje się z warunków glebowo-klimatycznych. Właściwiej będzie użyć wyraz "roślin" zamiast "upraw" i zakończyć zdanie sformułowaniem: "wyizolowanych z roślin uprawianych w różnych warunkach glebowo-klimatycznych".

W rozdziałach "Materiał i metody" oraz "Wyniki" Autor często używa określenia "grupa" w odniesieniu do różnych gatunków bakterii. Grupa to nie jest jednostka taksonomiczna. Pragnę przypomnieć, że w przypadku wirusów kiedy nie było możliwe zróżnicowanie ich na odrębne jednostki taksonomiczne takie jak gatunki, rodzaje i rodziny stosowano określenie "grupa" w stosunku do wirusów o podobnych cechach.

Autor używa różnych skrótów przy nazwach rodzajów bakterii. Na przykład na str. 16 w rozdziale "Przegląd literatury" przy nazwach rodzajów bakterii używa skrótu spp., a w następnym zdaniu wymienia nazwy rodzajów bakterii bez skrótów. W wielu innych miejscach w pracy używa przy nazwach rodzajów końcówki sp. Należy je ujednolicić. Liczby mnogiej w jęz. łacińskim tego skrótu czyli spp. używa się gdy bierze się pod uwagę



kilka lub wszystkie gatunki z rodzaju, rodziny i tak dalej. Czyli kiedy odnosi go się ogólnie do rodzaju powinno się stosować przy nazwie rodzaju zapis spp.

W tabelach 20A i 20B użyto nieprawidłowej nazwy rodzaju *Klebsiella* z nieprawidłowym skrótem przy tej nazwie sp., natomiast w tabelach 18A, 18 B, 18C i 18D użyto nieprawidłowej nazwy gatunku *Erwinia bilingiae*.

Niedociągnięcia, głównie językowe, które wykazałam w rozprawie w niczym nie podważają wartości merytorycznej przedstawionej pracy.

Rozprawa doktorska mgr Pawła Trzcíńskiego jest opracowaniem spełniającym wszystkie warunki wymagane odpowiednią ustawą dla dysertacji doktorskich.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska Pana mgr Pawła Trzcíńskiego zatytułowana „Izolacja i selekcja bakterii glebowych wpływających na wzrost roślin truskawki (*Fragaria x ananassa* Duch.)”, stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego oraz spełnia wymogi art. 14 ust. 2 pkt 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669), a stopień doktora może być nadany w dziedzinie i dyscyplinie określonej w przepisach wydanych na podstawie art. 5 ust. 3 tej ustawy.

W związku z powyższym, przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Ogrodnictwa - Państwowego Instytutu Badawczego wniosek o dopuszczenie Pana mgr Pawła Trzcíńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom recenzowanej rozprawy, wartość naukową i aplikacyjną przeprowadzonych badań wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Ogrodnictwa - Państwowego Instytutu Badawczego w Skierniewicach o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Pawła Trzcíńskiego stosowną nagrodą.

Lublin dn. 12.05.21

Prof. dr hab. Ewa Solarska

