



**Państwowa Wyższa Szkoła
Wschodnioeuropejska
w Przemyślu**

Przemyśl, dnia 24 maja 2022 r.

R E C E N Z J A

**rozprawy doktorskiej pt.: "Ocena występowania i molekularnego
różnicowania bakterii z rodzaju *Azotobacter* w glebach Polski"**

**wykonanej przez mgr Monikę Koziel
z Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa,
Państwowy Instytut Badawczy w Puławach
pod kierunkiem prof. dr hab. Stefana Martyniuka**

Nadesłana mi do recenzji praca doktorska pod w/w tytułem przedstawiona jest na 110 stronach maszynopisu podzielonego na dziewięć rozdziałów, które podzielone są z kolei na podrozdziały, w tym spis literatury obejmujący aż 170 najnowszych pozycji z ostatnich kilkunastu lat głównie polskich, i anglojęzycznych, które wykorzystano we wstępie pracy, celem wprowadzenia czytelnika w omawiany problem. Wyniki badań przedstawiono w 21 tabelach, 7 zdjęciach i 17 wykresach, co stanowi obszerną i bardzo dobrze przedstawioną dokumentację pracy.

Jednym z najważniejszych problemów współczesnej cywilizacji jest zachowanie dobrego zdrowia i samopoczucia dla wszystkich ludzi na całym świecie. Nasze zdrowie zależy od wielu czynników, ale jednym z najważniejszych jest zapewnienie żywności dla wciąż wzrastającej liczby ludności oraz utrzymanie stanu środowiska na poziomie lepszym niż go zastaliśmy, a w którym żyjemy, pracujemy i spędzamy wolny czas. Stąd świadomość naszych związków ze środowiskiem, w którym żyjemy, zaczyna dominować w większości podejmowanych przez człowieka działań prozdrowotnych i proekologicznych. Do ludzi dociera świadomość, że podejmując niekiedy proste działania, można nie niszczyć podstawowych elementów środowiska wyeliminować szkodliwe czynniki z naszego otoczenia, a prowadząc odpowiedni styl życia zachować zdrowie na długie lata.

Nasze bogactwa naturalne i zasoby środowiska mocno nadwyrężone w przeszłości, bez wątpienia nie wytrzymają dalszych obciążeń. Eksperti już dziś ostrzegają, szczególnie w krajach rozwijających się, a także i w Polsce, że wzrastająca liczba ludności pociągnie za sobą wzrost zapotrzebowania na żywność, którą produkować muszą rolnicy, a do tego potrzebują dobrej jakości

gleb, o dużej aktywności biologicznej i zawierającej liczne biogeny. Wydaje się, że nowoczesne rolnictwo wykorzystujące najnowsze zdobycze wiedzy z zakresu ekologii, biologii molekularnej, genetyki, inżynierii genetycznej i mikrobiologii mogą sprostać stojącym przed ludzkością zadaniom i przyczynić się do wzrostu aktywności i żyzności gleb. Nic więc dziwnego, że temat pracy doktorskiej p. mgr Moniki Kozieł związany jest z biologią, ekologią i zróżnicowaniem bakterii z rodzaju *Azotobacter* występujących w glebach Polski, a posiadających uzdolnienia do wiązania azotu atmosferycznego i wzbogacającego gleby w ten cenny pierwiastek plonotwórczy.

Należy zaznaczyć, że bakterie z rodzaju *Azotobacter*, to powszechnie występujące w różnych glebach światowych mikroorganizmy glebowe posiadające uzdolnienia do wiązania azotu atmosferycznego. Proces biologicznego wiązania azotu (BWAA) dostarcza corocznie do cyklu obiegu azotu około 140-170 mln ton tego pierwiastka, co ma ogromne znaczenie zarówno z ekologicznego jak i praktycznego punktu widzenia. Co prawda efektywność wiązania azotu atmosferycznego przez te bakterie jest stosunkowo wysoka i wynosi około 20 mg N na 1 g zużytej glukozy ale bakterie te są wrażliwe na liczne czynniki środowiskowe w tym odczyn gleby, zawartość materii organicznej, wilgotność czy zawartość składników pokarmowych, a ich liczebności w glebach są niewielkie. Jednakże bakterie te wydzielają do środowiska glebowego liczne substancje biologicznie czynne, które mają korzystny wpływ na rozwój roślin, co z ekologicznego punktu widzenia odgrywa bardzo ważną rolę w funkcjonowaniu ekosystemów rolniczych.

Dlatego jestem pełen uznania za trud podjęcia badań zmierzających do poznania warunków występowania, ekologicznych zależności i molekularnego zróżnicowania bakterii *Azotobacter* w glebach Polski. Podjęcie powyższych badań uważam za słuszne i celowe, a wykonanie ich z wykorzystaniem kolekcji gleb pochodzących z różnych regionów Polski, gdzie istnieje wiele naturalnych zależności i interakcji za bardzo cenne osiągnięcie Doktorantki.

1. Ocena pracy pod względem metodycznym

Przystępując do oceny recenzowanej pracy, jako rozprawy doktorskiej pragnę zaznaczyć, że zebrane wyniki dotyczą ogromnego zakresu badań wykonanych w warunkach laboratoryjnych. Powyższe badania stanowią cenne osiągnięcie naukowe z zakresu ekologii mikroorganizmów glebowych, wyjaśniające wiele problemów związanych z przemianami azotu prowadzonymi przez bakterie z rodzaju *Azotobacter*. Zastosowane metody badawcze oparte są na powszechnie stosowanych metodach mikrobiologicznych i genetycznych, są właściwie dobrane oraz zastosowane, pozwalające na udowodnienie postawionego celu. Praca wykonana jest poprawnie pod względem metodycznym. Na szczególne podkreślenie zasługują badania nad występowaniem bakterii *Azotobacter* w glebach całej Polski oraz badania nad procesem wiązania azotu

atmosferycznego przez poszczególne szczepy i ich zróżnicowanie genetyczne. Powyższe badania Doktorantka przeprowadziła wyjątkowo starannie, w licznych powtórzeniach, co zaowocowało wieloma bardzo interesującymi wynikami, które wzbogacą nasz wiedzę o ekologii i właściwościach fizjologicznych i genetycznych tej ważnej grupy bakterii glebowych.

2. Ocena pracy pod względem merytorycznym

Oceniana praca doktorska zawiera bardzo dobrze opracowaną część wstępną-przeglądową, w której autorka opisuje dotychczasowy dorobek naukowy w tej dziedzinie, dając wyraz swej doskonałej orientacji w najnowszych osiągnięciach badawczych nad rolą i znaczeniem drobnoustrojów wiążących wolny azot atmosferyczny w przyrodzie ze szczególnym uwzględnieniem tak skomplikowanych środowisk jakim są gleby o dużym zróżnicowaniu, pochodzeniu i zawartości składników pokarmowych.

Głównym celem wykonanej pracy doktorskiej były badania mikrobiologiczne, genetyczne i ekologiczne zmierzające do oceny występowania bakterii z rodzaju *Azotobacter* w próbkach gleb pobranych z obszaru Polski i poznanie wpływu różnych właściwości gleb na populację badanych bakterii oraz rozeznanie się w ich zróżnicowaniu genetycznym, a także identyfikacja izolatów szczepów *Azotobacter* na podstawie sekwencjonowania genu 16S rRNA.

Zamierzony cel osiągnięto poprzez szczegółową i bardzo dokładną analizę warunków występowania bakterii *Azotobacter*. Należy zaznaczyć, że niezależnie od interesujących badań mikrobiologicznych związanych z występowaniem bakterii z rodzaju *Azotobacter* w 1140 próbkach gleb pochodzących z terenu całej Polski, Doktorantka wykonała cały szereg dodatkowych badań związanych z charakterystyką fizjologiczną i genetyczną wyizolowanych szczepów *Azotobacter*, co stanowi ważną podbudowę teoretyczną prowadzonych badań mikrobiologicznych. Wszystkie badania były analizowane na tle aktualnie panujących warunków środowiskowych. Badania zostały zaplanowane bardzo dobrze.

W wyniku przeprowadzonych badań mikrobiologicznych Doktorantka uzyskała wyniki, które wiążą się z próbą wyjaśnienia wpływu czynników środowiskowych na występowanie i zróżnicowanie genetyczne bakterii z rodzaju *Azotobacter*. Szczególnie interesujące są wyniki dotyczące m.in.:

- zmian liczebności badanych bakterii z rodzaju *Azotobacter* w glebach z terenu całej Polski,
- zróżnicowania genetycznego bakterii *Azotobacter* występujących w glebach Polski,

Przeprowadzone badania są bardzo ważne pod względem naukowym i nie budzą zastrzeżeń natury merytorycznej. Jako oryginalne i bardzo ciekawe wnoszą one nowe elementy poznawcze do ekologii bakterii *Azotobacter* i ich

występowanie. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że czynniki środowiskowe jak: typ i rodzaj gleby oraz ich właściwości w tym odczyn mają istotny wpływ na występowanie i zróżnicowanie populacji tych bakterii w glebach Polski.

W oparciu o uzyskane wyniki z przeprowadzonych badań Doktorantka wyciągnęła wnioski, które sprecyzowane są bardzo rzeczowo i konkretnie. Do najważniejszych wniosków Doktorantki należy zaliczyć te, w których stwierdza, że bakterie należące do rodzaju *Azotobacter* zasiedlają około 43% gleb występujących w Polsce oraz inne, w których wykazała, że:

- Istnieje ścisła zależność ($r = 0,944$) pomiędzy zawartości części spławianych ($<0,02$ mm) w różnych gatunkach gleb a % ich zasiedleniem przez *Azotobacter* spp., co świadczy, że frakcja pyłowo-ilasta sprzyja zasiedlaniu przez bakterie *Azotobacter*.
- Liczebność *Azotobacter* spp. W glebach zasiedlonych przez te bakterie jest bardzo zróżnicowana w obrębie każdej analizowanej grupy gleb i waha się od kilku komórek (jtk) do kilkuset tysięcy jtk w 1 g gleby. Największą liczebność stwierdzono w niektórych glebach lessowych, pyłach zwykłych i piaskach gliniastych lekkich odpowiednio 297 tys., 45 tys. i 40 tys.
- Największą średnią liczebnością komórek *Azotobacter* spp. Charakteryzują się lessy, łąki, rzędziny i pyły ilaste, odpowiednio 13 tys., 2 tys., 1,9 tys., jtk/g, a najmniejszą żwir, piaski słabo gliniaste i piaski luźne, odpowiednio 44, 158 i 204 jtk/g gleby.
- Odczyn gleby jest bardzo ważnym czynnikiem wpływającym na występowanie bakterii *Azotobacter* spp. w środowisku glebowym. Bakterie te występują tylko w około 4% gleb o odczynie bardzo kwaśnym ($\text{pH} \leq 4,5$) i w 27% gleb kwaśnych ($\text{pH} 4,6 - 5,5$), natomiast zasiedlenie przez bakterie *Azotobacter* gleb o odczynie obojętnym ($\text{pH} 6,6 - 7,2$) i zasadowych ($\text{pH} > 7,2$) wynosiło odpowiednio 74% i 84%.
- Badane izotypy *Azotobacter* spp. Charakteryzowały się dużym zróżnicowaniem pod względem efektywności wiązania azotu atmosferycznego w warunkach laboratoryjnych. Nie stwierdzono jednak znaczącego wpływu właściwości gleb na kształtowanie zdolności zasiedlających je bakterie *Azotobacter* do wiązania N_2 bowiem zarówno z gleb żyznych o odczynie obojętnym jak i z gleb kwaśnych wyodrębniono izotypy intensywnie wiążące N_2 jak i szczepy mało aktywne pod tym względem.
- Stosując technikę ITS-PCR/RFLP (HaeIII i MspI) wyróżniono w obrębie badanych izolatów *Azotobacter* spp. Cztery profile genetyczne, a na podstawie wyników sekwencjonowania genu 16S rRNA 30 izolatów reprezentujących ww. profile stwierdzono, że wszystkie one należą do gatunku *Azotobacter chroococcum*, co wskazuje, że gatunek ten dominuje w glebach Polski.

Z obowiązku recenzenta powyższej rozprawy doktorskiej, zgłaszam następujące uwagi:

- Co to jest typ, rodzaj i gatunek gleby? Lessy – co to jest?
- Humus – próchnica glebowa, materia organiczna gleby, na jakie frakcje dzielimy materię organiczną gleby? Ile jej jest w glebach Polski?
- Na czym polega amplifikacja i sekwencjonowanie genu 16S rRNA?

- Jak wyglądała historia badań nad biologicznym wiązaniem azotu atmosferycznego (BWAA)?
- Jaki był wkład p. profesor Jadwigi Ziemięckiej w badania nad bakteriami *Azotobacter*?
- Jaka jest rola nitrogeneracji w BWAA u bakterii wolnożyjących, a jaka u bakterii symbiotycznych, u bakterii tlenowych i beztlenowych?
- Jakie właściwości posiadają komórki bakterii *Azotobacter* spp. do przetrwania w glebie o niekorzystnych warunkach środowiskowych?
- Drobne usterki stylistyczne powstałe podczas wydruku dysertacji, poprawiłem w tekście pracy.

Moje uwagi - nie mają charakteru krytycznego i oczywiście nie wpływają w najmniejszym stopniu na wartość naukową pracy, a są jedynie pytaniami i uwagami w dyskusji oraz powinny służyć lepszemu przygotowaniu pracy do druku.

3. Ocena pracy pod względem formalnym i strukturalnym

Praca napisana jest zwięźle i treściwie, stąd przedstawioną rozprawę p. mgr Moniki Kozieł oceniam bardzo wysoko. Uzyskane w Jej pracy wyniki wzbogacają naszą wiedzę z zakresu mikrobiologii i ekologii drobnoustrojów glebowych z rodzaju *Azotobacter*. Gromadzenie tego rodzaju faktów jest szczególnie cenne w obecnym czasie, kiedy środowisko naturalne poddawane jest różnej presji i widać negatywną ingerencję człowieka. Zanieczyszczenia i skażenia różnymi związkami chemicznymi, preparatami i odpadami przez przemysł i rolnictwo czynią, że coraz trudniej będzie uzyskać informacje o układach i zależnościach biologicznych panujących w środowisku naturalnym, co jest konieczne dla określenia w nich stopnia wywoływanych zmian. Należy podkreślić, że praca wykonana jest poprawnie pod względem formalnym, stylistycznym i językowym oraz nie budzi zastrzeżeń natury naukowej. Na uwagę zasługuje poprawny styl i język polski. Na specjalną pochwałę zasługuje sama redakcja pracy, którą wykonano bardzo estetycznie i wyjątkowo starannie, co dodatkowo świadczy o wszechstronnych uzdolnieniach Doktorantki.

4. Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę powyższe dane dotyczące oceny formalnej, metodycznej i merytorycznej pracy doktorskiej pani mgr Moniki Kozieł pt.:

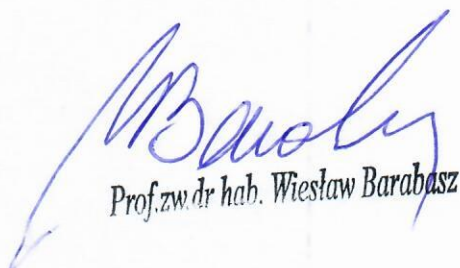
“Ocena występowania i molekularnego zróżnicowania bakterii z rodzaju *Azotobacter* w glebach Polski”

stwierdzam, że powyższa rozprawa stanowi niewątpliwie oryginalne i cenne osiągnięcie naukowe doktorantki w zakresie mikrobiologii gleby. Wykazała w prezentowanej pracy umiejętność organizacji i samodzielnej realizacji badań.

Duża znajomość literatury przedmiotu, opanowanie techniki badawczej z zakresu mikrobiologii i analityki molekularnej - wskazują na b. dobre przygotowanie doktorantki do pracy naukowej. Powyższa praca powinna być opublikowana.

W świetle powyższych danych uważam, że rozprawa doktorska pod w/w tytułem wykonana przez p. mgr Moniki Koziel kierunkiem **prof. dr hab. Stefana Martyniuka** w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim. W związku z powyższym stawiam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej IUNG w Puławach o dopuszczenie mgr Moniki Koziel do dalszych etapów postępowania przewodu doktorskiego.

Z uwagi na znaczenie naukowe tematu, duży wkład pracy własnej w badaniach oraz sposób przedstawienia wyników, ich opracowanie i omówienie stawiam wniosek do **Wysokiej Rady Naukowej IUNG w Puławach** o wyróżnienie powyższej rozprawy doktorskiej p. mgr Moniki Koziel - stosowną nagrodą.



Prof. zw. dr hab. Wiesław Barabasz