



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Poznań, 08.11.2022r.

dr hab. inż. Agnieszka Wolna-Maruwka, prof. UPP
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Rolnictwa Ogrodnictwa i Bioinżynierii
Katedra Gleboznawstwa i Mikrobiologii
ul. Szydlowska 50
60-656 Poznań

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej

Mgr Małgorzaty Martyny Woźniak

pt. „Bakteryjne endofity wybranych roślin uprawnych

**i chwastów – różnorodność biologiczna i ocena potencjału biotechnologicznego
w promowaniu wzrostu i rozwoju roślin”** wykonanej pod kierunkiem promotora

dr hab. Anny Gałązki, prof. IUNG-PIB

1. Podstawa opracowania recenzji

- Pismo Zastępcy Przewodniczącego Rady Naukowej Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa PIB w Puławach prof. dr hab. Janusza Podleśnego z dnia 17 października 2022 r., wystosowane w związku z uchwałą Rady Naukowej IUNG-PIB w Puławach, podjętą dnia 05 października 2022 r.,
- Umowa o dzieło z Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa PIB w Puławach, reprezentowanym przez Zastępcę Przewodniczącego Rady Naukowej Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa PIB w Puławach prof. dr hab. Janusza Podleśnego,
- Egzemplarz rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Woźniak pt. „Bakteryjne endofity wybranych roślin uprawnych i chwastów – różnorodność biologiczna i ocena potencjału biotechnologicznego w promowaniu wzrostu i rozwoju roślin”
- Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, z późniejszymi zmianami,
- Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora.

2. Ogólna charakterystyka – zasadność podjęcia tematu

Zbyt intensywna gospodarka rolna oparta na stosowaniu w nadmiarze nawozów mineralnych oraz chemicznych środków ochrony roślin, celem uzyskania maksymalnych plonów roślin, przyczynia się do zachwiania równowagi biologicznej gleby, przekładającej się na zaburzenia przemian składników pokarmowych, uodpornienie patogenów i szkodników, jak również doprowadza do zanieczyszczenia wód powierzchniowych i podziemnych. Obecnie przed rolnictwem stawia się więcej zadań, niż tylko produkcję produktów rolnych. Jednym z wyzwań dla współczesnego świata nauki jest opracowanie podstaw, które pozwolą usprawnić procesy fizjologiczne roślin użytkowych, wpływając na większe wykorzystanie ich potencjału biologicznego, bez negatywnego wpływu na środowisko. To właśnie drobnoustroje wykształciły wiele mechanizmów, które pozwalają dostosować się roślinom do zmieniającego się środowiska. Szczególną uwagę poświęca się bakteriom należącym do grupy PGPE (*Plant Growth Promoting Endophytic*), które uznano za potencjalne narzędzie promujące wzrost roślin w bardziej zrównoważony dla środowiska sposób, poprzez zmniejszenie zapotrzebowania na środki chemiczne i zapewnienie tolerancji na stesy biotyczne i abiotyczne.

Recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Woźniak koncentruje się na zagadnieniach dotyczących różnorodności bakterii endofitycznych oraz ich interakcji z roślinami. Tematyka podjętych badań jest aktualna i interesująca, wpisująca się w regulacje Europejskiej Strategii Bioróżnorodności. Stosując standardowe metody Autorka dokonała izolacji wybranych szczepów mikroorganizmów endofitycznych z części nadziemnych i podziemnych roślin uprawnych (kukurydza zwyczajna, pszenica zwyczajna ozima, żyto zwyczajne ozime, bobik) i chwastów (skrzyp polny, łopian większy), a następnie poddała je identyfikacji oraz różnicowaniu genetycznemu. Następnie określiła ich profil metaboliczny metodą Biolog GEN III MicroPlate oraz przeprowadziła charakterystykę biochemiczną, co pozwoliło na wytypowanie szczepów o wysokim potencjale biostymulacyjnym.

Niniejsze badania uważam za bardzo istotne, bowiem pomimo obserwowanego w ostatnich latach intensywnego rozwoju badań nad endofitami promującymi wzrost roślin, krajowy rynek biopreparatów i bionawozów nie jest w dalszym ciągu wystarczający. Cechuje go mała liczba produktów, zawierających szczepy mikroorganizmów wyselekcjonowane z polskich warunków klimatycznych. Natomiast najlepszą metodą uzyskania aktywnych i skutecznych izolatów mikroorganizmów jest ich pozyskiwanie z obszarów, gdzie przewiduje się je stosować.

Dlatego tematyka badań rozprawy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Woźniak jest niezwykle wartościowa. Wpisuje się bowiem w ważne zagadnienia długotrwałego zrównowżenia w sektorze rolniczym, pozwalając jednocześnie na lepsze poznanie i zrozumienie ekologii mikroorganizmów, biologii roślin żywicielskich oraz pozytywnego wpływu drobnoustrojów na rośliny.

3. Formalna ocena rozprawy

Rozprawa doktorska została przygotowana w formie manuskryptu, składającego się ze spójnego tematycznie zbioru artykułów, opublikowanych w czasopismach naukowych. Badania zaprezentowane w rozprawie doktorskiej sfinansowano z tematu badawczego 1.21 pt. „Identyfikacja molekularna i biochemiczna bakterii endofitycznych i ich zastosowanie w promowaniu wzrostu roślin”, realizowanego w ramach działalności Statutowej IUNG-PIB, w latach 2017-2019 (Kierownik projektu: mgr Małgorzata Martyna Woźniak).

W skład manuskryptu wchodzi dwie oryginalne publikacje naukowe oraz pięć przeglądowych, o łącznym sumarycznym *Impact Factor* wynoszącym 6.503 oraz liczbie punktów wg wykazu MEiN równej 242 (zgodnie z rokiem wydania).

Zbiór ten stanowi zwięzłe omówienie podjętego w ramach rozprawy doktorskiej problemu badawczego, zawartego w następujących publikacjach naukowych:

1. Woźniak M., Gałązka A., Grządziel J., Głodowska M. (2018): The identification and genetic diversity of endophytic bacteria isolated from selected crops. *The Journal of Agricultural Science*, 156, 4: 547-556.
2. Woźniak, M., Gałązka, A., Tyśkiewicz R., Jaroszuk-Ściśel J. (2019): Endophytic Bacteria Potentially Promote Plant Growth by Synthesizing Different Metabolites and their Phenotypic/Physiological Profiles in the Biolog GEN III MicroPlate TM Test. *International Journal of Molecular Sciences*, 20.
3. Łyszcz M., Gałązka A. (2016): Proces biologicznego wiązania azotu atmosferycznego [w] *Studia i Raporty IUNG-PIB – Siedliskowe i agrotechniczne uwarunkowania produkcji roślinnej w Polsce*, 49(3), ISBN 978 83 7562 234 8, red. Podleśny J., Puławy, Dział Upowszechniania i Wydawnictw IUNG - PIB w Puławach, s. 59-70.
4. Łyszcz M., Gałązka A. (2017): Metody oparte o amplifikację DNA techniką PCR wykorzystywane w ocenie bioróżnorodności mikroorganizmów glebowych. *KOSMOS – Problemy Nauk Biologicznych*, 66 (315), 193-206.
5. Łyszcz M., Głodowska M. (2017): Bakterie endofityczne i ich wpływ na wzrost i rozwój roślin [w] *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce – Ochrona środowiska*,

ISBN: 978-83-65677-63-1, red. Nyćkowiak J., Leśny J., Poznań, Młodzi Naukowcy, s. 65 – 70.

6. Łyszcz M., Gałązka A. (2017): Genetyczne metody różnicowania mikroorganizmów w systemie gleba–roślina. *Postępy Mikrobiologii*, 56, 3: 341–352.
7. Woźniak, M., Gałązka A. (2019): The rhizosphere microbiome and its beneficial effects on plants—current knowledge and perspectives. *Advancements of microbiology - Postępy Mikrobiologii*, 58(1), 59-69.

We wszystkich artykułach naukowych Doktorantka jest pierwszym autorem, a z załączonych oświadczeń dotyczących współautorstwa wynika, że Jej indywidualny wkład w powstanie prac był bardzo znaczący, wynoszący odpowiednio od 80% do 95%. W trakcie opracowywania publikacji brała udział w tworzeniu koncepcji badań, wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu wyników badań i zgromadzeniu materiału literaturowego, jak również napisaniu manuskryptów oraz ustosunkowaniu się do uwag recenzentów.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej objęto prawidłowo sformułowanym tytułem „Bakteryjne endofity wybranych roślin uprawnych i chwastów – różnorodność biologiczna i ocena potencjału biotechnologicznego w promowaniu wzrostu i rozwoju roślin” i przedstawiono w postaci 169 - stronicowego opracowania, obejmującego 12 rozdziałów, zaprezentowanych w następującej kolejności: Wstęp, Przegląd literatury, Hipoteza badawcza i cel badań, rozdział czwarty to Materiał i metody badawcze, a w piątym zaprezentowano najważniejsze wyniki badań. Kolejne rozdziały stanowią Dyskusję i podsumowanie wyników, Wnioski końcowe, Wykaz tabel i figur oraz Spis literatury.

Ponadto na początku opracowania zamieszczono wykaz najważniejszych skrótów i akronimów stosowanych w manuskrypcie, a na jego końcu załączono streszczenie w języku polskim i angielskim oraz siedem prac wchodzących w skład rozprawy wraz z oświadczeniami Doktorantki i Współautorów.

4. Merytoryczna ocena pracy

W pierwszym rozdziale osiągnięcia, który stanowi „Wstęp” Doktorantka wprowadza w zakres prowadzonych badań oraz przedstawiła uzasadnienie podjęcia problemu badawczego. W 9 - stronicowym „Przeglądzie literatury” będącym kolejnym rozdziałem dysertacji porusza niezwykle istotną z punktu widzenia rolnictwa i ochrony środowiska tematykę dotyczącą innowacyjnych rozwiązań, które będą ekologicznie bezpiecznymi alternatywami w stosunku do agrochemikaliów. Układ treści w rozdziale uważam za bardzo logiczny, a poszczególne tematy ułożone są w prawidłowej kolejności.

Początkowo Pani mgr Małgorzata Woźniak odnosi się do najważniejszych celów zrównoważonego rolnictwa w świetle globalnych zmian związanych z Zieloną Rewolucją. Następnie wprowadza w tematykę endosymbiozy oraz mechanizmów promowania wzrostu i rozwoju roślin przez bakterie PGPE, którą szczegółowo przedstawiła w dwóch publikacjach, składających się na rozprawę doktorską (poz. nr 3 i 5). Podkreślając, że bakteryjne endofity stanowią duży rezerwuar nieodkrytej różnorodności genetycznej i funkcjonalnej, dlatego tak niezwykle istotne jest stosowanie skutecznych metod ich izolacji oraz identyfikacji biochemicznej i genetycznej, Autorka sprawnie przechodzi do kolejnego podrozdziału, w którym prezentuje metody badań endofitów. Całość zamyka ostatni podrozdział zatytułowany „Przyszłość endofitów bakteryjnych w rolnictwie”, z którego jednoznacznie wynika, że wykorzystanie PGPE w rolnictwie ma ogromny potencjał w zakresie zmniejszania negatywnego wpływu nawozów chemicznych i pestycydów na środowisko. Niniejsza tematyka bardzo dogłębnie zaprezentowana została przez Panią mgr Małgorzatę Woźniak, w publikacji będącej częścią dysertacji opublikowanej w czasopiśmie Postępy Mikrobiologii (poz. nr 7).

Kolejny, trzeci rozdział opracowania przedstawia jasno i precyzyjnie sformułowaną hipotezę badawczą oraz cel główny i pięć celów szczegółowych, które zmierzają do zweryfikowania, czy autochtoniczne szczepy endofitów bakteryjnych wyizolowane z wybranych roślin uprawnych i chwastów posiadają w warunkach *in vitro* wysoki potencjał biostymulacyjny. Dodatkowo czy roślina-gospodarz ma decydujący wpływ na różnorodność genetyczną i skład endofitów. Uważam, że niniejszy rozdział jasno wyznacza kierunek podjętych badań, odnosząc się do zastosowanych technik badawczych.

W kolejnym rozdziale „Materiały i metody badawcze” Autorka szczegółowo opisała materiał badawczy zastosowany w przeprowadzonych eksperymentach oraz metodykę badań, która bardzo dokładnie zaprezentowana została w przedstawionych publikacjach, składających się na rozprawę doktorską (poz. nr 1, 2, 4, 6). Na uznanie zasługuje bardzo złożony warsztat metodyczny Doktorantki. Począwszy od standardowych metod izolacji 45 szczepów bakterii oraz określenia ich aktywności biochemicznej, obejmującej ocenę zdolności izolatów do wytwarzania związków podobnych do kwasu indolilo-3-octowego, sideroforów, solubilizacji fosforanów oraz wiązania azotu atmosferycznego Pani mgr Małgorzata Woźniak zastosowała nowoczesne metody profilowania metabolicznego bakterii oraz oceny ich zróżnicowania genetycznego.

Uważam, że Doktorantka wykazała wysoką umiejętność wyboru i łączenia technik badawczych. Na tej podstawie mogę stwierdzić, że w stopniu bardzo dobrym opanowała warsztat badawczy, wymagający dużego nakładu pracy. Dobór metod zapewnił Jej

przeprowadzenie kompleksowych badań, w wyniku których otrzymała szereg wartościowych wyników, zaprezentowanych w kolejnym rozdziale „Wyniki badań” .

W niniejszym rozdziale Pani mgr Małgorzata Woźniak w sposób syntetyczny opisała rezultaty badań przedstawione w poszczególnych publikacjach, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (poz. nr 1 i 2). Jest to część dysertacji napisana w sposób zwięzły i zrozumiały, precyzyjne podzielona na wzajemnie uzupełniające się bloki tematyczne. Pomimo wielu wyników Doktorantce udało się stworzyć spójny opis, tworzący logiczną i bardzo przejrzystą całość. Jest to część pracy, w której prawidłowo scharakteryzowano efekty badań, uzyskując istotne informacje na temat:

- wpływu gatunku rośliny – gospodarza na grupowanie izolatów bakteryjnych oraz ich zróżnicowanie genetyczne i skład,
- zależności aktywności metabolicznej endofitów bakteryjnych od rodzaju bakterii i gatunku rośliny żywicielskiej,
- ilości mechanizmów promujących wzrost roślin występujących u testowanych izolatów bakterii,
- możliwości doboru odpowiedniego nośnika dla testowanych szczepów bakterii endofitycznych w biopreparatach, na podstawie analizy ich profilu metabolicznego (test BIOLOG GEN III),
- możliwości dalszego ich wykorzystania w rolnictwie, jako alternatywy dla agrochemikaliów.

W rozdziale siódmym „Dyskusja i podsumowanie wyników” Autorka przeprowadziła wnikliwą dyskusję uzyskanych wyników, odnosząc się do osiągnięć innych badaczy. Sposób interpretacji rezultatów badań wskazuje na wysoki poziom Jej dojrzałości naukowej. W tej części rozprawy Doktorantka podkreśliła, że wyizolowane szczepy bakterii endofitycznych zostały sklasyfikowane łącznie do 10 rodzajów, z dominacją *Rhizobium* sp. oraz *Delftia* sp. Wykazała również, że testowane izolaty różniły się zdolnością do produkcji związków pozytywnie oddziałujących na wzrost i rozwój roślin. Ponadto bakterie charakteryzowały się wystąpieniem dwóch lub większej liczby mechanizmów biostymulacji roślin. Pani mgr Małgorzata Woźniak udowodniła również, że aktywność metaboliczna endofitów zależna była od rodzaju bakterii, a nie od gatunku rośliny żywicielskiej.

Merytoryczną część opracowania kończą wnioski, z których wynika że wybrane szczepy analizowanych bakterii endofitycznych, ze względu na potencjał biostymulacyjny stanowiąc

mogą punkt wyjścia do konstruowania komercyjnego biopreparatu przeznaczonego do upraw roślin, prowadzonych zarówno w warunkach szklarniowych, jak i polowych.

Reasumując stwierdzam, że publikacje składające się na rozprawę doktorską stanowią spójną całość, która powstała na podbudowie bardzo aktualnej i dobrze przemyślanej koncepcji badań. Opracowania o charakterze przeglądowym będące częścią dysertacji przygotowano w sposób prawidłowy. Cechuje je atrakcyjna szata graficzna, ułatwiająca czytelnikowi zapoznanie się z tematyką badawczą dysertacji. Dokonując szerokiego przeglądu literatury Doktorantka równocześnie wskazała na zasadność podjętego tematu badawczego. Pomimo wielu wyników badań własnych pozyskanych w oparciu o zastosowanie precyzyjnych i nowoczesnych metod badawczych, Autorce udało się je w sposób bardzo syntetyczny i logiczny przedstawić, dodatkowo poprawnie opracowując statystycznie. Pani mgr Małgorzata Woźniak udowodniła tym samym, że posiada ogromny potencjał analityczny oraz duże zdolności w ocenie oraz interpretacji wyników badań.

Reasumując oceniana rozprawa doktorska prezentuje wysoką wartość naukową ze względu na kompleksowe podejście do realizowanej problematyki badawczej oraz aplikacyjny charakter badań. W trakcie czytania niniejszej dysertacji nasunęło mi się kilka pytań, dlatego proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich:

- 1). Czy Pani zdaniem uzyskane informacje dotyczące potencjału biostymulującego izolatów są wystarczające, żeby testować je w warunkach *in vivo*? Czy może warto byłoby przeprowadzić jeszcze dodatkowe badania, które pozwoliłyby na zwiększenie skuteczności ich działania w promowaniu wzrostu roślin w warunkach rzeczywistych?
- 2) Jeden z wniosków końcowych brzmi „Analiza profilu metabolicznego bakterii może stanowić ważne narzędzie w doborze komponentów nośnika...”. Proszę więc o wyjaśnienie, jakiego rodzaju nośniki najczęściej stosowane są do namnażania mikroorganizmów w skali przemysłowej oraz które z nich wskazałaby Pani jako najodpowiedniejsze, w przypadku konstruowania biopreparatu lub bionawozu zawierającego w swoim składzie analizowane endofity?
- 3) Wykazała Pani, że testowane szczepy posiadają tzw. kompetencje endofityczne i stanowią rdzeń rodzimych bakterii endofitycznych w danym obszarze. Proszę o doprecyzowanie, w jaki sposób następuje kolonizacja roślin przez endofity oraz w stosunku, do których gatunków roślin kierowany będzie w przyszłości biopreparat/bionawóz wytworzony na bazie badanych mikroorganizmów?

5. Wniosek końcowy

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Woźniak stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wnosi cenny wkład w poszerzenie wiedzy w zakresie znaczenia bakterii endofitycznych w zrównoważonym rolnictwie. Należy podkreślić, że opiniowana dysertacja zasługuje na uznanie, bowiem świadczy o bardzo dobrej znajomości podjętej problematyki badawczej, jak i biegłości warsztatowej Doktorantki.

W świetle powyższej oceny, rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Woźniak spełnia warunki wymagane Ustawą z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003r. Nr 65 poz. 595 z późn.zm.), w związku z artykułem. 179 ust. 3 Ustawy z dnia 3 lipca 2018r. i przepisach wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 30 sierpnia 2018r. poz. 1669) i wnioskuję o jej dopuszczenie do publicznej obrony.

Biorąc pod uwagę wartość naukową recenzowanej dysertacji, jej wysoką wartość merytoryczną i aplikacyjną oraz opublikowanie wyników badań w wysoko punktowanych czasopismach z listy *Journal Citation Reports*, wnioskuję o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.



Poznań, dnia 8 listopada 2022 r. dr hab. inż. Agnieszka Wolna-Maruwka, prof. UPP