



**UMCS**

UNIwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Wydział Biologii i Biotechnologii

dr hab. Sylwia Wdowiak-Wróbel, prof. UMCS  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej  
Instytut Nauk Biologicznych  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Katedra Genetyki i Mikrobiologii  
ul. Akademicka 19  
20-033 Lublin

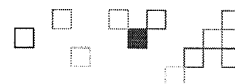
Lublin, 14.06.2024

## RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Joanny Świątczak

pt. „Wpływ ryzobakterii na wzrost rzepaku i rodzime społeczności drobnoustrojów w ryzosferze” wykonanej pod kierunkiem promotora dr hab. Marii Swiontek-Brzezińskiej, prof. UMK w Katedrze Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Podstawą do opracowania recenzji jest pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne dr hab. Dariusza J. Smolińskiego, prof. UMK informujące, że Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu w dniu 19.04.2024 r. w wyniku głosowania i na mocy Uchwały nr 27 wyznaczyła mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Joanny Świątczak pt. „Wpływ ryzobakterii na wzrost rzepaku i rodzime społeczności drobnoustrojów w ryzosferze”. Rozprawa doktorska wchodzi w zakres dziedziny nauki biologiczne.



## 1. Wybór tematu i jego uzasadnienie

Kapusta rzepek (*Brassica napus* L. var. *napus*) jest rośliną oleistą która znalazła szerokie zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu. Jej nasiona wykorzystywane są do produkcji oleju jadalnego (olej rzepakowy), z którego produkuje się także inne tłuszcze spożywcze. Olej rzepakowy jest źródłem cennych kwasów tłuszczowych omega-3, a dodatkowo charakteryzuje się niską zawartością nasyconych kwasów tłuszczowych. Śruta poekstrakcyjna jest wykorzystywana, jako pasza dla zwierząt hodowlanych. Rzepek jest także rośliną miododajną o dużym znaczeniu w pszczelarstwie. Oprócz zastosowania w przemyśle spożywczym i rolnictwie olej rzepakowy stosowany jest także w przemyśle chemicznym przy produkcji biodiesla. Należy jednak zauważyć, że rzepek jest wymagającą uprawą i wymaga nawożenia, głównie azotowego. Stosowanie nawozów mineralnych i środków ochrony roślin przyczynia się do zanieczyszczenia gleb oraz wód powierzchniowych i podziemnych, zwiększa efekt cieplarniany oraz zmniejsza bioróżnorodność organizmów. Poszukuje się w związku z tym rozwiązań umożliwiających zwiększenie wydajności plonowania, przy ograniczeniu negatywnych skutków stosowania nawozów. Takim rozwiązaniem wpisującym się w strategię "od pola do stołu", elementu Europejskiego Zielonego Ładu, może być zastosowanie mikroorganizmów, szczególnie PGPR, tj. ryzobakterii promujących wzrost i rozwój roślin.

W swojej rozprawie doktorskiej Pani mgr Joanna Świątczak skupia się na zagadnieniach dotyczących różnorodności bakterii endofitycznych, ich potencjalnych właściwościach promowania wzrostu roślin, wpływu wyselekcjonowanych szczepów na skład i różnorodność zbiorowisk bakteryjnych i grzybowych w ryzosferze *B. napus* oraz na ich interakcjach z roślinami. Podjęta tematyka badań jest aktualna, a uzyskane wyniki mają znaczenie poznawcze i potencjalnie użytkowe. Stosując standardowe metody Doktorantka pozyskała 300 izolatów bakteryjnych pochodzących z ryzosfery rośliny uprawnej - rzepaku, uprawianego na obszarze województwa kujawsko-pomorskiego (Górska) oraz województwa warmińsko-mazurskiego

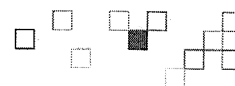


(Ostróda). Następnie przeanalizowała izolaty pod kątem mechanizmów promocji wzrostu i rozwoju roślin (produkcja IAA, sideroforów, cyjanowodoru, amoniaku, solubilizacji fosforanów, aktywność deaminazy ACC i chitynaz). Przeprowadzona analiza umożliwiła wytypowanie szczepów o wysokim potencjale biostymulacyjnym. Wybrane szczepy zostały przebadane pod kątem wpływu na wzrost i plonowanie rzepaku. W ich genomach zidentyfikowano także genów, których produkty potencjalnie odpowiadają za promowanie wzrostu roślin. Określono również wpływ inokulacji szczepami *Bacillus* sp. i *Pseudomonas* sp. na liczebność grup mikroorganizmów uczestniczących w obiegu azotu oraz na bioróżnorodność strukturalną i funkcjonalną mikrobiomu ryzosfery rzepaku.

**Przeprowadzone badania uważam za bardzo istotne, bowiem pomimo wzrostu w ostatnim czasie zainteresowań bakteriami endofitycznymi, nadal nie ma zbyt wielu biopreparatów i bionawozów, które mogą być stosowane jako alternatywa dla sztucznych środków ochrony roślin oraz nawozów. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka podjęła próbę pozyskania aktywnych i skutecznych izolatów z obszarów, gdzie uprawiany jest rzepak i gdzie te szczepy mogą znaleźć zastosowanie jako biostymulatory. Zaprezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej badania uważam za słuszne i konieczne. Tematyka podjęta przez Doktorantkę wpisuje się w model zrównoważonego rolnictwa, alternatywy dla stosowania sztucznych nawozów w uprawach roślin. Dostarcza także informacji na temat ekologii mikroorganizmów oraz wpływu wybranych grup bakterii na rozwój gospodarza roślinnego, tj. rzepaku.**

## 2. Struktura pracy

Rozprawa doktorska została przygotowana w formie manuskryptu, w skład którego wchodzi powiązane tematycznie artykuły, opublikowane w czasopismach posiadających współczynnik wpływu Impact Factor. Należy podkreślić, że badania wykonane w ramach rozprawy doktorskiej były finansowane z grantu Debiuty-IDUB (2020/21): "Effect of plant



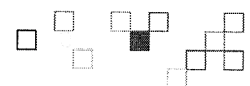
growth-promoting rhizobacteria on rape growth and their influence on native microbial population”.

W skład rozprawy doktorskiej wchodzi cztery oryginalne publikacje naukowe o sumarycznym Impact Factor wynoszącym 23,91 oraz liczbie punktów wg wykazu MNiSW równej 400.

Podjęty problem badawczy został przedstawiony w następujących publikacjach naukowych:

1. Świątczak, J., Kalwasińska, A., Felföldi, T., Swiontek Brzezinska, M., 2023. *Bacillus paralicheniformis* 2R5 and its impact on canola growth and N-cycle genes in the rhizosphere. FEMS Microbiology Ecology, 99(9), p.fiad093.
2. Świątczak, J., Kalwasińska, A., Szabó, A., Swiontek Brzezinska, M., 2023. The effect of seed bacterization with *Bacillus paralicheniformis* 2R5 on bacterial and fungal communities in the canola rhizosphere. Microbiological Research, 275, p.127448.
3. Świątczak, J., Kalwasińska, A., Swiontek Brzezinska, M., 2024. Plant growth-promoting rhizobacteria: *Peribacillus frigorigerans* 2RO30 and *Pseudomonas sivasensis* 2RO45 for their effect on canola growth under controlled as well as natural conditions. Frontiers in Plant Science, 14, p.1233237.
4. Świątczak, J., Kalwasińska, A., Szabó, A., Swiontek Brzezinska, M., 2023. *Pseudomonas sivasensis* 2RO45 inoculation alters the taxonomic structure and functioning of the canola rhizosphere microbial community. Frontiers in Microbiology, 14, p.1168907.

Należy podkreślić, że we wszystkich artykułach naukowych Doktorantka jest pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym. W trakcie przygotowywania publikacji uczestniczyła w tworzeniu koncepcji badań, przeprowadzała analizy laboratoryjne oraz statystyczne, a także opracowywała wyniki badań. Brała również udział w doborze literatury i napisaniu manuskryptów.



Opracowanie obejmuje 7 rozdziałów, zaprezentowanych w następującej kolejności: (i) Wstęp, (ii) Cel pracy, hipotezy badawcze i zakres badań, (iii) Wykaz czterech publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, (iv) Dyskusja i podsumowanie uzyskanych wyników, (v) Wnioski, (vi) Bibliografia oraz rozdział dotyczący Dorobku naukowego Doktorantki (vii). Ponadto na początku opracowania znajduje się streszczenie w języku polskim i angielskim. **W ogólnej ocenie praca napisana jest w sposób czytelny i przejrzysty oraz poprawnym pod względem stylistycznym językiem. Rozprawa doktorska przedstawiona jest bardzo starannie i estetycznie.**

### 3. Merytoryczna ocena rozprawy

Oceniana rozprawa doktorska rozpoczyna się od "Streszczenia" w języku polskim i angielskim, w którym Doktorantka pokrótce wyjaśnia cel podjętych badań oraz krótkie podsumowanie uzyskanych wyników.

We wstępie pracy doktorskiej Autorka przedstawiła przegląd literatury, związanej z podjętą problematyką badawczą. Rozdział ten stanowi wprowadzenie do poruszanej tematyki, dostarczając między innymi informacji na temat gospodarza roślinnego badanych izolatów bakteryjnych, charakterystyki PGPR oraz możliwości ich wykorzystania w rolnictwie. Dodatkowo omówione zostały mechanizmy wykorzystywane przez PGPR do promocji wzrostu roślin, wpływ inokulacji PGPR na strukturę mikrobiomu ryzosfery, czy też metody stosowane w oznaczaniu bioróżnorodności mikroorganizmów. Przedstawiony w tym rozdziale układ treści jest logiczny, a przedstawione tematy ułożone są w odpowiedniej kolejności.

W kolejnym rozdziale "Cele pracy, hipotezy badawcze i zakres badań" w jasny i precyzyjny sposób przedstawione zostały hipotezy badawcze oraz szczegółowe cele pozwalające na zweryfikowanie postawionych hipotez. Przedstawione cele badawcze dotyczyły między innymi charakterystyki i identyfikacji bakterii pozyskanych z ryzosfery korzeni rzepaku, pochodzącego z dwóch regionów Polski (uprawy w województwie kujawsko-pomorskim i w województwie



warمیńsko-mazurskim). Dodatkowo badania miały na celu: ocenę wpływu ryzobakterii na poprawę wzrostu i rozwoju rzepaku, identyfikację genów zaangażowanych w promocję wzrostu roślin i biokontrolę fitopatogenów, określenie wpływu inokulacji ryzosfery PGPR na liczebność mikroorganizmów związanych z obiegiem azotu oraz bioróżnorodność zbiorowisk bakteryjnych i grzybowych. Cele pracy zostały sprecyzowane prawidłowo. W odniesieniu do celów Autorka sformułowała i przedstawiła 3 hipotezy badawcze, które zostały zweryfikowane w trakcie badań, stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej. Zakres prac podzielono na osiem zadań badawczych, które odpowiadają celom i hipotezom badawczym. Doktorantka opisała materiał badawczy wykorzystany w doświadczeniach oraz skróconą metodykę badań, która dokładnie została opisana w przedstawionych publikacjach, składających się na rozprawę doktorską (rozdział iii). Na szczególne podkreślenie zasługuje odpowiedni wybór metod i technik badawczych przez Doktorantkę, co umożliwiło precyzyjne przeprowadzenie badań i weryfikację uzyskanych wyników. Pani mgr Joanna Świątczak zastosowała zarówno standardowe metody izolacji szczepów bakterii (300 izolatów), jak i określiła ich aktywność biochemiczną, obejmującą ocenę zdolności do produkcji kwasu indolilo-3-octowego, cyjanowodoru, amoniaku, sideroforów, solubilizacji fosforanów oraz aktywności enzymatycznej deaminazy ACC i chitynaz. Dodatkowo Doktorantka wykorzystwała nowoczesne metody profilowania mikroorganizmów pod kątem aktywności metabolicznej oraz metody oparte na analizie genomów mikroorganizmów. **Uważam, że Doktorantka bardzo dobrze dobrała techniki badawcze oraz wykazała się wysoką umiejętnością ich łączenia. Na tej podstawie mogę stwierdzić, że Doktorantka w stopniu bardzo dobrym opanowała warsztat badawczy, wymagający dużego nakładu pracy.**

W rozdziale "Wyniki" Doktorantka przedstawiła rezultaty badań w formie czterech publikacji, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Należy podkreślić, że wyniki badań zostały opublikowane w czasopismach naukowych posiadających wysoki współczynnik wpływu (IF). Przedstawione prace badawcze stanowią spójną, logiczną całość. Zostały wykonane poprawnie pod względem merytorycznym i naukowym. Przeprowadzone badania wykazały, że:



-ryzosfera korzeni rzepaku uprawianego w dwóch gospodarstwach rolnych (w Górsku i Ostródzie), jest siedliskiem wielu mikroorganizmów endofitycznych (pozyskano 300 izolatów), wykazujących potencjalne właściwości promocji wzrostu i rozwoju roślin

-w oparciu o analizę porównawczą genu 16S rRNA stwierdzono, że 12 izolatów charakteryzujących się najlepszymi właściwościami promocji wzrostu roślin, reprezentuje rodzaje *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. i *Peribacillus* sp.

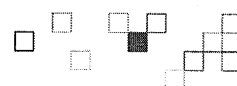
-spośród 12 wyselekcjonowanych szczepów dwa z nich promowały wzrost rośliny gospodarza - rzepaku (*Bacillus paralicheniformis* 2R5 i *Pseudomonas sivasensis* 2RO45)

-oba przebadane szczepy posiadały aktywność antagonistyczną w stosunku do wybranych fitopatogenów grzybowych

-analiza genomów *Bacillus paralicheniformis* 2R5 i *Pseudomonas sivasensis* 2RO45 pozwoliła na identyfikację genów zaangażowanych w promocję wzrostu roślin oraz biosyntetycznych klastrów genów zaangażowanych w biokontrolę fitopatogenów

-badane szczepy wpływały na bioróżnorodność strukturalną i funkcjonalną mikroorganizmów ryzosferowych

W rozdziale "Wnioski" Doktorantka dokonała podsumowania uzyskanych wyników, wskazując, że gleba pochodząca z ryzosfery korzeni rzepaku jest środowiskiem charakteryzującym się dużą różnorodnością biologiczną i źródłem bakterii posiadających zdolność promocji wzrostu roślin. Należy zauważyć, że dwa spośród przebadanych i opisanych szczepów, tj. *Bacillus paralicheniformis* 2R5 i *Pseudomonas sivasensis* 2RO45, nie były do chwili obecnej znane ze swoich możliwości promocji wzrostu rzepaku. Analizowane szczepy endofityczne pozytywnie wpływały na bioróżnorodność strukturalną, a w przypadku *Pseudomonas sivasensis* 2RO45 dodatkowo funkcjonalną ryzosfery korzeni rzepaku. Obecność w genomach tych bakterii, genów i klastrów genów, zaangażowanych w promocję wzrostu roślin i wykazujących aktywność przeciw fitopatogenom grzybowych wskazuje na możliwość wykorzystania szczepów, jako inokulantów w celu poprawy wydajności plonowania rzepaku.



Mogą także pozwolić na zmniejszenie zużycia środków ochrony roślin i sztucznych nawozów, co wpisuje się w model zrównoważonego rolnictwa.

**Stwierdzam, że publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej stanowią spójną całość, opartą na dobrze przemyślanej koncepcji badań. Pomimo wielu wyników badań, pozyskanych przy użyciu różnych metod badawczych, Doktorantka przedstawiła je w sposób syntetyczny, logiczny i poprawnie opracowała statystycznie. Należy podkreślić, że założenia pracy oraz ich realizacja świadczą o bardzo dobrej znajomości i przygotowaniu warsztatowym Doktorantki do podjętej tematyki badawczej. Rozprawa doktorska prezentuje wysoką wartość naukową wynikającą z kompleksowego podejścia do realizowanej problematyki badawczej oraz potencjalnego aplikacyjnego charakteru badań.**

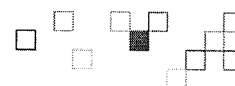
Pragnę zwrócić uwagę na pewne nieścisłości i niedociągnięcia, dotyczące merytorycznej bądź edytorskiej strony pracy, które moim zdaniem wymagają uzupełnienia lub korekty. Należy jednak podkreślić, że nie umniejszają one wartości i ważności przedstawionego problemu badawczego i nie rzutują na merytoryczną ocenę pracy:

-strona 14 "Bakterie PGPR za pomocą kompleksu enzymów azotazowych są w stanie przekształcić azot atmosferyczny ( $N_2$ ) w amoniak ( $NH_3$ )." Sformułowanie "enzymów azotazowych" zastąpiłabym "kompleksu enzymatycznego – nitrogenazy".

- strona 18 "... *Actinomycete* sp. ..." – bardziej poprawne będzie użycie *Actinomycetes* sp.

- strona 30 "...przeprowadzono analizę określenia liczebności..." – myślę, że lepiej brzmi "...określono liczebność..."

- strony 38 i 41 "Ponadto, w niniejszej rozprawie doktorskiej wykryto obecność genów ...." ; "W niniejszej rozprawie doktorskiej zaobserwowano również wzrost udziału bakterii..." – Obecność tych genów wykryto raczej w trakcie analizy genomu badanych endofitów, a nie w rozprawie doktorskiej. Podobnie w drugim przypadku, to raczej w trakcie badań, a nie w rozprawie, zaobserwowano wzrost udziału bakterii. Uważam, że to sformułowanie jest niefortunne.





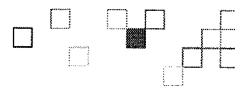
- strona 38 "Gen *nifH* umożliwi bakteriom wiązanie azotu..." w tym przypadku lepiej było użyć określenia "Produkt genu *nifH* umożliwia...."
- W rozprawie doktorskiej zabrakło informacji na jakiej podstawie ustalona została przynależność gatunkowa 12 wybranych izolatów. Czy była to analiza oparta jedynie na genie 16S rRNA? Czy też przy ustaleniu pozycji na poziomie gatunku wzięto pod uwagę także inne geny markerowe?
- Czy sekwencje genu 16S rRNA i sekwencje genomowe zostały zdeponowane w jakiejś bazie danych? Nie znalazłam takiej informacji dla wszystkich sekwencji.
- W pracy nie ma wyjaśnienia dlaczego mimo aktywności enzymu deaminazy ACC, nie zidentyfikowano genu kodującego ten enzym w genomie bakterii *Bacillus paralicheniformis* 2R5

#### 4. Dobór i wykorzystanie piśmiennictwa

Doktorantka wykorzystwała przy przygotowaniu rozprawy 159 pozycji literatury anglojęzycznej. Wiele z tych pozycji pochodzi z ostatnich lat, co potwierdza ważność i aktualność podjętego problemu przez Doktorantkę. Materiały źródłowe zostały prawidłowo dobrane. Pewne zastrzeżenie budzi brak kursywy przy użyciu łacińskich nazw rodzajowych i gatunkowych, nie umniejsza to jednak wartości pracy przy tak licznie cytowanym piśmiennictwie.

#### 5. Wniosek końcowy

Przedstawione w recenzji uwagi nie podważają merytorycznej wartości rozprawy doktorskiej mgr Joanny Świątczak. Stanowią jedynie sugestie i są podstawą do dyskusji. Przedstawiona rozprawa jest kompleksowym opracowaniem prezentującym zagadnienia związane z identyfikacją, charakterystyką i zastosowaniem PGPR, jako alternatywy dla sztucznych nawozów i środków ochrony roślin. Należy podkreślić, że przedstawione przez



**Panią mgr Joannę Świąteczak osiągnięcie naukowe ma duży potencjał aplikacyjny. Należy także zauważyć, że Doktorantka w pełni zrealizowała postawione w pracy cele badawcze.**

Przedstawiona do oceny rozprawa mgr Joanny Świąteczak pt. „Wpływ ryzobakterii na wzrost rzepaku i rodzime społeczności drobnoustrojów w ryzosferze”, wykonana pod naukową opieką Pani dr hab. Marii Swiontek-Brzezińskiej, prof. UMK w pełni mieści się w dyscyplinie nauki biologiczne i spełnia warunki określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2022 poz. 574 z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Wojciech Lmowy*

