

Prof. dr hab. Katarzyna Hrynkiewicz
Katedra Mikrobiologii, Instytut Biologii
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Lwowska 1, 87-100 Toruń
Tel. +48 (56) 611-25-40
E-mail: hrynk@umk.pl

Toruń 29.12.2024

Podstawa formalna opinii

Opinia została sporządzona dla Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne, w postępowaniu w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych w dyscyplinie nauki biologiczne, zgodnie z decyzją podjętą na posiedzeniu Komisji w dniu 5 listopada 2024 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr Aleksandry Anny Walaszczyk

p.t. „Szczepy *Bacillus* i *Pseudomonas* zdolne do produkcji biosurfaktantów – charakterystyka mechanizmów aktywności przeciwgrzybowej i ocena potencjału aplikacyjnego w obecności wybranych zanieczyszczeń antropogennych”

w postępowaniu dotyczącym nadania stopnia naukowego doktora
w dyscyplinie nauki biologiczne

Recenzja została przygotowana zgodnie z wymaganiami zawartymi w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce oraz w oparciu o stanowisko recenzenta w sprawie dopuszczenia mgr Aleksandry Anny Walaszczyk do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr A. Walaszczyk została napisana pod kierunkiem promotora - **dr hab. Katarzyny Paraszkiwicz, prof. UŁ**, w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

1. Ocena układu rozprawy doktorskiej oraz informacje o jej poszczególnych częściach składowych

Struktura pracy jest zgodna z ogólnymi zasadami i wymogami stawianymi rozprawom doktorskim i powstała w oparciu o wyniki opisane w formie monografii oraz dwie spójne tematycznie prace naukowe opublikowane w renomowanych i wysoko punktowanych czasopismach naukowych, specjalistycznych dla danej dziedziny i dyscypliny, które ukazały się w latach 2023-2024: **(P-1)** Scientific Reports, 2023 (MNiSW: 140 pkt / IF_{5-letni}: 4.3) [DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41210-5>], **(P-2)** International Journal of Molecular Sciences, 2024 (MNiSW: 140 pkt / IF_{5-letni}: 5.6) [DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms25084175>]. łączna liczba punktów MNiSW dla powyższych prac naukowych wynosi 280, natomiast sumaryczny IF 9,9. We wszystkich tych publikacjach Pani mgr A. Walaszczyk jest pierwszym autorem. Jak wynika z oświadczeń dołączonych do rozprawy doktorskiej Doktorantka pełniła wiodącą rolę w przygotowywaniu powyższych publikacji naukowych (P-1 i P-2) na wszystkich etapach ich powstawania. Jej wkład polegał na: (1) przygotowaniu koncepcji prac, (2) realizacji badań (m.in. przygotowaniu hodowli drobnoustrojów, wykonaniu ekstrakcji herbicydów i biosurfaktantów z hodowli bakteryjnych, określeniu wpływu mikroplastiku i herbicydów na aktywność przeciwgrzybową bakterii oraz wykonaniu analiz za pomocą technik mikroskopowych, określeniu wpływu azoksystrobiny na aktywność przeciwgrzybową bakterii oraz przepuszczalność błon grzyba, wykonaniu ekstrakcji azoksystrobiny i biosurfaktantów z hodowli), (3) interpretacji uzyskanych wyników, (4) przeprowadzeniu analiz statystycznych, (5) przygotowaniu manuskryptów (m.in. opracowaniu wyników, pisanie manuskryptów) oraz (6) współudziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Stosowne oświadczenia Doktorantki i pozostałych współautorów publikacji o procentowym wkładzie autorskim oraz pracach wykonywanych podczas prowadzenia doświadczeń i przygotowywaniu publikacji naukowych zostały zamieszczone w końcowej części rozprawy doktorskiej (str. 208-216). Udział procentowy współautorstwa Pani A. Walaszczyk wskazany w oświadczeniach dla dwóch publikacji stanowiących część rozprawy doktorskiej wynosił odpowiednio 60% (P-1; łączna liczba współautorów - pięć) i 55% (P-2; łączna liczba współautorów - siedem).

Tytuł rozprawy odpowiada treściom zawartym w dysertacji. Rozprawa doktorska składa się z dwunastu rozdziałów obejmujących: Wprowadzenie, Cele pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski i stwierdzenia końcowe, Streszczenie (w języku polskim i angielskim), Oświadczenia współautorów, Całkowity dorobek naukowy oraz Literaturę (rozdziały te zawarte zostały na stronach 1-247). Do pracy dołączono kopie dwóch publikacji naukowych. Na początku rozprawy doktorskiej zamieszczono Wykaz skrótów, który w znacznym stopniu ułatwił zapoznanie się z treściami zawartymi w pracy. Praca została przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim.

2. Znaczenie i aktualność zagadnień zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej

Choroby grzybowe mogą stanowić istotne zagrożenie dla upraw rolnych, prowadząc do znaczących strat ekonomicznych i wpływając na bezpieczeństwo żywnościowe. W celu ochrony roślin przed patogenami grzybowymi, np. *Fusarium*, często stosowane są fungicydy, które mogą mieć negatywny wpływ na środowisko i organizmy żywe, w tym mikroorganizmy korzystne dla wzrostu i rozwoju roślin. Alternatywą dla syntetycznych fungicydów są biofungicydy, czyli środki ochrony roślin wykorzystujące komórki drobnoustrojów i/lub ich metabolity, które są mniej toksyczne dla ludzi i zwierząt, co przyczynia się do ochrony ekosystemów i zachowania bioróżnorodności środowiska naturalnego. Do głównych mechanizmów działania mikrobiologicznych fungicydów należą m.in.: konkurencja o przestrzeń i składniki pokarmowe, synteza substancji hamujących wzrost patogenów grzybowych (np. antybiotyków i enzymów litycznych), indukcja naturalnych mechanizmów obronnych roślin (ang. *Induced Systemic Resistance*; ISR). Bakterie należące do rodzajów *Bacillus* i *Pseudomonas*, mogą odgrywać kluczową rolę w ochronie roślin przed patogenami grzybowymi i jednocześnie stymulować wzrost i rozwój roślin (PGP - ang. *Plant Growth Promoting*). Ich potencjał, pomimo wielu prowadzonych w tym zakresie prac badawczych, nie został jednak całkowicie poznany.

Ważną rolę w ochronie roślin przed patogenami grzybowymi ale również stymulacji wzrostu roślin mogą pełnić biosurfaktanty (amfifilowe związki organiczne syntetyzowane m.in. przez mikroorganizmy), które m.in.: (i) oddziałują z błonami komórkowymi patogenów, prowadząc do ich permeabilizacji, depolaryzacji i ostatecznej lizy, (ii) zapobiegają adhezji i tworzeniu biofilmów przez patogeny na powierzchni roślin, (iii) aktywują szlaki sygnalizacyjne w roślinach, prowadząc do wzmocnienia odporności systemicznej, (iv) pomagają korzystnym mikroorganizmom (np. bakteriom ryzosferowym) zajmować nisze ekologiczne, ograniczając przestrzeń i zasoby dla patogenów, (v) uwalniają składniki odżywcze z trudnodostępnych źródeł, rozpuszczają hydrofobowe struktury glebowe, poprawiając dostępność środków ochrony roślin i ich skuteczność w zwalczaniu patogenów glebowych. Należy również podkreślić, że biosurfaktanty są biodegradowalne, co czyni je alternatywą dla syntetycznych fungicydów i pestycydów i zmniejsza ryzyko kumulacji toksycznych substancji w środowisku.

W przedstawionej do recenzji rozprawie Doktorantka podjęła się niezwykle ważnego wyzwania, którego celem było określenie wpływu zanieczyszczeń pochodzenia antropogenicznego, no. Pozostałości syntetycznych pestycydów, mikroplastyków, barwniki przemysłowe (np. azowe), które mogą wpływać na fitopatogenne właściwości bakterii *Bacillus* i *Pseudomonas* i modyfikować ich metabolizm i zdolności antagonistyczne.

Problem badawczy opisany w pracy doktorskiej jest zgodny z przyjętą w ramach Europejskiego Zielonego Ładu strategią „Od pola do stołu”, która zakłada zmniejszenie do 2030 roku o 50% stosowanych chemicznych środków ochrony roślin oraz promocję alternatywnych metod ochrony roślin, w tym wspierane metod biologicznych, które zminimalizują użycie związków chemicznych.

3. Wskazanie oraz ocena celu pracy Kandydata

Głównym celem przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej była ocena wpływu zanieczyszczeń antropogenicznych (herbicydów, fungicydów, barwników azowych, mikroplastiku) na aktywność przeciwgrzybową ryzosferowych szczepów *Bacillus* i *Pseudomonas*, zdolnych do syntezy cyklicznych lipopeptydów, i pochodzących ze środowisk o zróżnicowanym poziomie zanieczyszczeń antropogenicznych.

Badania opisane w pracy przeprowadzono w oparciu o 6 prawidłowo sformułowanych celów szczegółowych (opisane na str. 20), które obejmowały: (1) identyfikację i analizę poziomu produkcji biosurfaktantów wydzielanych przez szczepy *Bacillus* i *Pseudomonas*, (2) ocenę aktywności przeciwgrzybowej i wskazanie mechanizmów ograniczania wzrostu szczepów *Fusarium* przez bakterie *Bacillus* i *Pseudomonas*, (3) charakterystykę wybranych szczepów bakteryjnych pod kątem wpływu na kiełkowanie nasion i wzrost siewek ogórka siewnego, (4) analizę produkcji biosurfaktantów w hodowlach mieszanych bakteryjno-grzybowych oraz w hodowlach zawierających komórki dwóch różnych szczepów *Bacillus*, (5) ocenę wzrostu bakterii, produkcji biosurfaktantów i aktywności przeciwgrzybowej w hodowlach *Bacillus* i *Pseudomonas* prowadzonych w obecności zanieczyszczeń środowiskowych, (6) opracowanie efektywnego podłoża wzrostowego dla wybranego szczepu bakteryjnego charakteryzującego się wysoką i stabilną (także w obecności zanieczyszczeń) aktywnością przeciwgrzybową oraz pozytywnym wpływem na kiełkowanie i wzrost siewek ogórka siewnego.

Wyznaczone cele szczegółowe pracy obejmują bardzo szeroki aspekt prac badawczych mających na celu określenie roli bakterii należących do rodzajów *Bacillus* i *Pseudomonas* w ochronie roślin przed patogenami grzybowymi, łącznie z promowaniem wzrostu roślin w niekorzystnych warunkach środowiskowych.

W pracy doktorskiej nie przedstawiono typowych hipotez badawczych, jednak Wstęp pracy zakończony został podrozdziałem zatytułowanym „Bieżące wyzwania”, w którym Doktorantka opisuje najważniejsze problemy środowiskowe związane z obecnością syntetycznych pestycydów, mikroplastiku i barwników azowych w środowisku w kontekście upraw roślin oraz koniecznością podejmowania badań naukowych nad biofungicydami. Jest to w mojej opinii bardzo dobry wstęp do kolejnej części pracy, w której przedstawiono zakres metodyczny podjętych badań.

4. Najważniejsze wyniki pracy doktorskiej przedstawione w rozprawie doktorskiej i ich znaczenie

Wyniki uzyskane podczas realizacji projektu doktorskiego zostały opisane w pracy doktorskiej na str. 40-164 i stanowią najbardziej obszerną i rozbudowaną część rozprawy. Struktura tej części rozprawy ma strukturę hybrydową i oparta jest na prezentacji i opisie wyników, które nie zostały jak dotąd opublikowane oraz dwóch opublikowanych pracach naukowych.

Nieopublikowana część wyników badań została zaprezentowana w dziesięciu podrozdziałach, w których zaprezentowano odpowiednio: (1) charakterystykę profilu produkcji cyklicznych lipopeptydów szczepów *Bacillus* i *Pseudomonas*, (2) ich charakterystykę pod kątem aktywności przeciwgrzybowej wobec wybranych szczepów *Fusarium* (hodowle stałe i płynne), (3) wpływ szczepów bakteryjnych na wzrost korzeni

ogórka siewnego, (4) identyfikację wybranych szczepów bakteryjnych, (5) ocenę produkcji cLP-Bc w płynnych hodowlach bakteryjno-grzybowych, (6) ocenę wzrostu, produkcji biosurfaktantów i aktywności przeciwgrzybowej bakterii *Bacillus* i *Pseudomonas* w obecności zanieczyszczeń antropogenicznych (barwniki azowe, mikroplastik, herbicydy), (7) produkcję cLP i aktywność przeciwgrzybową w hodowlach mieszanych w obecności syntetycznych fungicydów, (8) wpływ bakterii oraz ich metabolitów na przepuszczalność błon, zmiany w lipidomie grzybni oraz kiełkowanie zarodników, (9) ocena aktywności przeciwgrzybowej wybranych szczepów *Bacillus* wobec grzybów *Fusarium* z wykorzystaniem nasion ogórka siewnego, (10) opracowanie podłoża wzrostowego do hodowli bakterii *Bacillus* z wykorzystaniem produktów ubocznych przemysłu spożywczego. Podrozdział 6 został dodatkowo uzupełniony dwiema opublikowanymi pracami naukowymi (P-1 i P-2).

Prace badawcze Doktorantka rozpoczęła od analizy 80 szczepów bakteryjnych (77 szczepów *Bacillus* i 3 szczepy *Pseudomonas*) pochodzących ze środowisk zanieczyszczonych antropogenicznie, dla których wyznaczyła profile produkcji biosurfaktantów oraz oceniła aktywność przeciwgrzybową wobec dwóch patogennych grzybów – *F. culmorum* DSM 1094 i *F. sambucinum* IM 6525. W oparciu o wybrane kryteria, np.: miejsce izolacji szczepu, profil i poziom produkcji cLP, aktywność przeciwgrzybową, zdolność do degradacji zanieczyszczeń oraz wpływ na kiełkowanie nasion i wzrost siewek ogórka siewnego, wyselekcjonowała pulę szczepów, które wykorzystała w dalszych badaniach. W większości były to szczepy *Bacillus* zdolne do produkcji dwóch lub trzech biosurfaktantów o budowie cLP (fengicyny, surfaktyny i ituryny). W badaniach wykorzystano technikę LC–MS/MS do ilościowej oceny surfaktyny i ituryny oraz technikę MALDI–TOF/TOF do jakościowej oceny produkcji fengicyny. Wykazano, że spośród 6 badanych szczepów, trzy wykazywały zdolność do produkcji wszystkich trzech cLP. Najwyższym poziomem produkcji surfaktyny (109,2 mg L⁻¹) charakteryzował się szczep *Bacillus* Kol B1, natomiast ituryny (517,1 oraz 420,1 mg L⁻¹) ustalono izolaty *Bacillus* Kol S11 i Kol Si4.

Ocena aktywności przeciwgrzybowej badanych szczepów bakteryjnych wobec szczepów grzybów z rodzaju *Fusarium* wykazała, że szczep *Bacillus* sp. Kol B2 była najbardziej skuteczny, hamując wzrost grzybni *F. culmorum* DSM 1094 o 55,9%, a *F. sambucinum* IM 6525 o 40,0%. Ponadto, w przypadku 22 hodowli *dual culture* z grzybnią *F. sambucinum* IM 6525 (spośród 75 zbadanych), zaobserwowano kolonizację powierzchni strzępek przez bakterie oraz intensywny, dendrytyczny wzrost populacji bakteryjnej w kierunku macierzystej kolonii bakteryjnej, co hamowało wzrost grzybni. Zaobserwowano, że szczepy zdolne do kolonizacji strzępek szczepu patogennego IM 6525 częściej syntetyzowały iturynę (> 200 mg L⁻¹) oraz fengicynę niż te, które nie wykazywały tej zdolności. W pracy zbadano również zdolność 32 szczepów bakteryjnych do produkcji przeciwgrzybowych związków o charakterze lotnym (VOCs). Największy hamujący wpływ wykazały szczepy *Bacillus* sp. Kol B3 oraz *Bacillus* sp. KAS 2.2, które hamowały wzrost grzybni powierzchniowej szczepu DSM 1094 o odpowiednio 74,9 oraz 71,0%. Wielka szkoda, że w badaniu tym nie podjęto się oznaczenia związków lotnych, a badania ograniczono do pomiaru i obserwacji grzybni badanych patogenów.

Badania przeprowadzone w hodowlach płynnych wykazały najwyższą aktywność przeciwgrzybową dla szczepów *Bacillus* Kol B1, Kol Si4 oraz Kol Si6, dla których ograniczenie wzrostu grzybni szczepu DSM 1094 wynosiło odpowiednio 75,5; 73,9 oraz 81,8%, a wzrostu szczepu IM 6525 odpowiednio 81,7; 80,1 oraz 80,6%. Mając na uwadze powyższe dane można wnioskować, że wyselekcjonowanie najbardziej efektywnych szczepów nie jest

łatwym zadaniem, co wskazuje na potencjalne trudności w zaprojektowaniu efektywnego biofungicydu.

W związku z tym w kolejnych badaniach zastosowano hodowle bakteryjne zawierające dwa różne szczepy *Bacillus*, aby ocenić czy współdziałanie bakterii różnych szczepów może zwiększać produkcję biosurfaktantów i w konsekwencji prowadzić do silniejszego efektu przeciwgrzybowego. Badania wykazały, że w przypadku 10 spośród 37 zbadanych bakteryjnych hodowli mieszanych aktywność powierzchniowa płynów pohodowlanych była wyższa niż w przypadku monokultur. Niestety, w znacznej większości przypadków aktywność przeciwgrzybowa w układzie zawierającym dwa szczepy *Bacillus* nie była istotnie wyższa niż w układach zawierających tylko jeden szczep *Bacillus*, zaś układ badawczy zawierający grzybnie *F. oxysporum* KKP 458 oraz bakterie szczepów Kol D3 i DSM 3257 stanowił wyjątek.

Znaczna część wyników badań przedstawionych w pracy doktorskiej uwzględniała analizy wpływu wybranych zanieczyszczeń antropogenicznych [barwniki azowe (AB113, RB5, AMR, RO16 oraz SY), MP oraz herbicydy (MET i 2,4-D) i fungicydy (AZ i PR)] na syntezę biosurfaktantów / aktywność powierzchniową płynów pohodowlanych oraz zdolność wybranych szczepów *Bacillus* i *Pseudomonas* do ograniczania wzrostu grzybów *F. culmorum* DSM 1094 oraz *F. sambucinum* IM 6525. Wykazano także, że trzy szczepy (*P. koreensis* ASK 10, *P. fluorescens* ASK 68 oraz *Bacillus* sp. Zg 8.6) mają zdolność do dekoloryzacji wszystkich użytych w badaniu barwników azowych, zaś pozostałe szczepy nie dekoloryzowały jedynie barwnika SY. Barwniki azowe nie miały jednak istotnego wpływu na aktywność przeciwgrzybową bakterii. Badania z uwzględnieniem MP wykazały, że obecność MP w hodowlach szczepów *Bacillus* nie ma znaczącego wpływu na produkcję surfaktyny, ale istotnie wpływa na produkcję ituryny w przypadku czterech z 19 badanych szczepów.

Badania nad przepuszczalnością błon patogenów grzybowych wykazały, że wszystkie analizowane w doświadczeniu bakterie (5 szczepów) zwiększały przepuszczalność błon obu badanych szczepów grzybni (DSM 1094 oraz IM 6525), a wyniki te silnie korelują z wynikami dotyczącymi aktywności przeciwgrzybowej.

Analizy dotyczące wpływu badanych szczepów bakteryjnych na wzrost ogórka siewnego wykazały, że spośród 32 badanych szczepów bakteryjnych 53,1% szczepów ograniczało wzrost korzeni ogórka siewnego, 40,6% nie miało istotnego wpływu, a tylko 6,3% szczepów stymulowało wzrost korzeni ogórka. Najbardziej korzystny wpływ miał szczep bakterii *Bacillus* sp. Kol B9. Jednocześnie potwierdzono, że zaprawianie nasion ogórka siewnego zawiesiną bakterii szczepu *Bacillus* sp. Kol B9 chroni nasiona i siewki ogórka przed niekorzystnym wpływem grzybni *F. culmorum* DSM 1094 oraz *F. sambucinum* IM 6525.

Głównym celem prac badawczych opisanych w publikacji P-1 (Scientific Reports, 2023; DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41210-5>) ocena wpływu mikroplastików (MPs) na usuwanie herbicydów (metolachlor, MET; kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy, 2,4-D) i produkcję biosurfaktantów (surfaktyny i ituryny) przez *Bacillus* sp. Kol L6 aktywnych przeciwko *Fusarium culmorum*. Badania wykazały, że *Bacillus* sp. Kol L6 eliminuje 40-55% MET i 2,4-D, ale proces ten jest hamowany przez MP. Zanieczyszczenia nie ograniczały syntezy surfaktyny, jednak wydzielanie ituryny obniżyło się o ponad 70% w obecności wszystkich trzech zanieczyszczeń. *Bacillus* sp. Kol L6 ograniczał wzrost fitopatogenicznego *F. culmorum* DSM1094F w obecności pojedynczych zanieczyszczeń i ich dwuskładnikowych mieszanin, przy czym w obecności wszystkich trzech testowanych zanieczyszczeń wzrost grzyba był ograniczony tylko częściowo (o nie więcej niż 40%).

Publikacja ta jest pierwszą pracą naukową, w której opisano wpływ MP na usuwanie 2,4-D i MET oraz syntezę biosurfaktantów przez szczep *Bacillus* aktywny przeciwko fitopatogennym grzybom z rodzaju *Fusarium*. Badania potwierdzają, że mikrobiologiczna bioremediacja może być ekologiczną, opłacalną i skuteczną metodą usuwania pestycydów. Uzyskane wyniki nie tylko wnoszą nową wiedzę w danej dyscyplinie ale są również niezwykle cenne w obliczu obserwowanych w ostatnich latach zatrważających wzrostów ilości zanieczyszczeń antropogenicznych, np. mikroplastików (MPs) i pestycydów, w ekosystemach lądowych i wodnych.

Głównym celem badań podjętych i zaprezentowanych w publikacji P-2 (International Journal of Molecular Sciences, 2024; DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms25084175>) była ocena wpływu syntetycznego fungicydu azoksystrobiny (AZ) i produkującego biosurfaktanty szczepu *Bacillus* sp. Kol B3 na wzrost fitopatogenicznego grzyba *Fusarium sambucinum* IM 6525. Badania wykazały wyższą aktywność przeciwgrzybową gdy połączono czynniki biotyczne i abiotyczne. Zaobserwowano m.in. hamowanie wzrostu grzybów, zmiany w morfologii strzępek, przepuszczalności błon grzybów i poziomach wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (ROS). Bakterie we wspólnych hodowlach z *Fusarium* i AZ zmieniły proporcje wytwarzanych biosurfaktantów (surfaktyny i ituryny). Zaobserwowano wzrost biosyntezy ituryny. Obniżenie zawartości AZ (20%) wykazano jedynie w 72-godzinnej kulturze bakteryjno-grzybowej. Ponadto, w hodowlach grzybowych (z dodatkiem i bez dodatku bakterii) wykryto obecność metabolitu AZ o nazwie wolny kwas azoksystrobinowy.

Do przeprowadzenia analiz zaprezentowanych w publikacji P-2 wykorzystano szeroki wachlarz technik laboratoryjnych, np. metodę chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS), techniki mikroskopowe i testy biochemiczne, co w mojej opinii zasługuje na duże uznanie, gdyż prezentuje wyniki oparte na wielu, wzajemnie uzupełniających się obserwacjach.

Wyniki zaprezentowane w P-2 są ważne z punktu widzenia zagrożenia związanego ze stosowaniem środków chemicznych i ich wpływu na środowisko oraz pojawiania się odpornych na ich stosowanie fitopatogenów. Syntetyczne fungicydy mają długi okres półtrwania i mogą utrzymywać się w środowisku przez dłuższy czas wywierając negatywny na aktywność mikroorganizmów glebowych innych niż fitopatogeny, w tym mikroorganizmów promujących wzrost roślin (PGPM). Wyniki uzyskane w publikacji P-2 mają duży potencjał do zastosowania praktycznego i obniżenia zagrożeń wynikających ze stosowania fungicydów w rolnictwie.

5. Podsumowanie

Praca doktorska mgr Aleksandry Walaszczyk jest niezwykle obszerna i prezentuje szeroko zakrojony zestaw dobrze zaplanowanych i wzajemnie uzupełniających się doświadczeń, w których dogłębnie bada i analizuje możliwe rozwiązania i czynniki mogące mieć wpływ na rozwiązanie podjętego problemu badawczego. Praca stanowi zbiór oryginalnych wyników przedstawiających nową i przydatną wiedzę z zakresu badań nad bakteriami promującymi wzrost roślin i hamującymi rozwój patogenów również w obecności niekorzystnych czynników abiotycznych, które mogą przyczyniać do opracowania nowych technologii stosowanych w rolnictwie i ochronie środowiska naturalnego. Doświadczenia przeprowadzono przy użyciu zróżnicowanych i dobrze dobranych technik laboratoryjnych. Wyniki zostały dokładnie przeanalizowane i omówione na podstawie najbardziej aktualnej i

związanej z tematem badawczym literatury naukowej. Rozprawa doktorska została przygotowana niezwykle starannie i poprawnie napisana pod względem edytorskim.

6. Uwagi

Etap przygotowywania i pisanie rozprawy doktorskiej to pierwszy krok młodego naukowca na jego drodze do dalszej kariery naukowej. Na tym etapie mogą pojawiać się pewne niedociągnięcia, które z pewnością w przyszłości zostaną wyeliminowane. Dlatego też sugestie, które wymieniam poniżej mają na celu zwrócenie Doktorantce uwagi na nieco słabsze strony pracy doktorskiej, tak aby mogła udoskonalić w przyszłości swój warsztat badawczo-naukowy i z sukcesem osiągać kolejne, niezwykle ważne cele naukowe.

1. Większość bakterii, które wybrano do badań nad promowaniem wzrostu roślin (w tym uprawnych) i ochroną przed patogenami, należała do rodzaju *Bacillus*. Jakie aspekty / właściwości tej grupy bakterii predestynują je do zastosowania praktycznego w uprawach roślin. Proszę o uzupełnienie tego tematu podczas rozprawy doktorskiej.
2. W pracy zbadano wpływ wielu czynników stanowiących zanieczyszczenie antropogeniczne w kontekście poszukiwania bakterii o właściwościach hamujących rozwój patogenów grzybowych w uprawach roślin jadalnych. Czy znane są wyniki badań nad uprawą roślin
3. W metodach opisanych dla wyników, które nie zostały opublikowane w P-1 i P-2 opisano metodę identyfikacji izolatów bakteryjnych. W paragrafie tym (str. 28) nie podano informacji o sprawdzeniu czystości DNA przed wykonaniem reakcji amplifikacji. Czy chromatogramy uzyskane po sekwencjonowaniu charakteryzowały się odpowiednią jakością oraz czy po złożeniu ich w kontigi uzyskano dobre pokrycie się sekwencji? W pracy niestety brak informacji na ten temat.
4. W Tabeli 9 na str. 59-60 zamieszczono wyniki identyfikacji 23 wybranych do dalszych badań izolatów bakteryjnych opartych na analizie 16S rRNA w oparciu 10 starterów opisanych w Tabeli 4 (str. 29). W pracy nie wyjaśniono dlaczego zastosowano w badaniach tak szeroki wachlarz starterów do identyfikacji bakterii oraz dlaczego wyniki przeprowadzonej z wykorzystaniem sekwencjonowania i analizy BLAST wykazały tak niskie podobieństwo genetyczne do sekwencji zdeponowanych w bazie NCBI. W Tabeli tej nie wskazano również procentowego podobieństwa do sekwencji znajdujących się a bazie NCBI oraz brakuje numerów akcesyjnych. Sekwencje uzyskane dla pary primerów 27F/1492R oraz gyrA47F/gyrA1066R są zdecydowanie zbyt krótkie i powinny wynosić odpowiednio 1400 i 1000 bp.
5. Na Rycinie 24 (str. 84) oraz na Rycinach 25-28 (str. 86-92) różnice istotne statystycznie oznaczano małymi literami alfabetu łacińskiego, wskazując że wartości oznaczone tą samą literą w ramach wykresu nie różnią się od siebie istotnie ($p < 0,05$). Nie uwzględniono jednak kolejności alfabetycznej zastosowanych liter wraz ze wzrastającymi/malejącymi wartościami średnimi uzyskanymi dla poszczególnych wariantów doświadczenia.
6. Na Rycinie 29 (str. 113) przedstawiającej intensywność wzrostu grzybni *F. culmorum* DSM 1094 oraz *F. sambucinum* IM 6525 w obecności bakterii

niewłaściwie zastosowano oznaczenia literowe wskazujące na różnice istotne statystycznie. Alfabetyczna kolejność liter zastosowanych do oznaczenia różnic powinna być zgodna z prezentowanymi wzrastającymi/malejącymi wartościami. Na wykresie nie zawsze ta zasada znajduje zastosowanie.

7. Podobna uwaga dotyczy również innych zaprezentowanych w pracy wyników, np. Ryciny 30 zaprezentowanej na str. 115, Ryciny 31 zaprezentowanej na str. 116, Ryciny 32 zaprezentowanej na str. 117, Ryciny 33 zaprezentowanej na str. 118, Figury 1 zaprezentowanej w P-2 (str. 3), Figury 3 zaprezentowanej w P-2 (str. 7).
8. W publikacji P-2 w Tabeli S1 (*Supplementary materials*) zaprezentowano wyniki identyfikacji szczepu bakteryjnego Kol B3 na podstawie podobieństwa sekwencji genu *tuf* do sekwencji przechowywanych w bazie danych NCBI. Niestety wyniki te zostały opublikowane bez nadania numeru akcesyjnego w NCBI.

9. Wnioski

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Aleksandry Walaszczyk przedstawia szeroko zakrojone i dobrze zaprezentowane wyniki badań, co wpływa na jej ogólny bardzo wysoki poziom merytoryczny. Liczba moich uwag nie wpływa na ogólną **bardzo dobrą** ocenę pracy. Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668). W związku z powyższym, wnioskuję do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie mgr Aleksandry Walaszczyk do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.

Jednocześnie, zwracam się do Członków Komisji o **wyróżnienie pracy doktorskiej** mgr Aleksandry Walaszczyk ze względu na jej **szczególne walory poznawcze**. W pracy doktorskiej prowadzone były badania naukowe nad ważnym zagadnieniem dotyczącym możliwości wykorzystania bakterii do promowania wzrostu roślin uprawnych i jednoczesnego ograniczania stosowania fungicydów w środowisku naturalnym. Jest to niezwykle ważne z punktu widzenia ochrony zdrowia człowieka oraz środowiska. Badania przyczyniły się do uzyskania nowej wiedzy w zakresie biotechnologicznych rozwiązań opartych na naturze i ochronie środowiska naturalnego, co ma istotny wpływ na rozwój wiedzy naukowej w dyscyplinie nauki biologiczne.

Prof. dr hab. Katarzyna Hryniewicz