



Poznań, 20 stycznia 2025 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Walaszczyk

zatytułowanej

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

Podstawą formalną sporządzenia niniejszej recenzji jest pismo Przewodniczącej Komisji
Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne Pani
prof. dr hab. Agnieszki Marczak

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska została wykonana przez mgr Aleksandrę
Walaszczyk na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska, w Katedrze Mikrobiologii
Przemysłowej i Biotechnologii Uniwersytetu Łódzkiego. Promotorem rozprawy jest dr hab.
Katarzyna Paraszkievicz, prof. UŁ.

Biosurfaktanty to naturalne związki powierzchniowo czynne, które odgrywają
kluczową rolę w wielu procesach biologicznych i przemysłowych. To ekologiczna alternatywa
dla syntetycznych związków powierzchniowo czynnych. Wyróżniają się one stosunkowo dużą
podatnością na biodegradację, niską toksycznością, jak i możliwością wykorzystania do ich
produkcji surowców odnawialnych. Ponadto biosurfaktanty mogą skutecznie hamować rozwój
patogennych grzybów roślinnych, wspierając ochronę upraw bez ryzyka akumulacji
szkodliwych substancji. Ich zastosowanie sprzyja zrównoważonemu rolnictwu i ogranicza
konieczność użycia chemikaliów, co przyczynia się do ochrony bioróżnorodności i zdrowia
ludzi. Pomimo licznych badań w tym zakresie, cały czas istnieją obszary wymagające
uzupełnienia istniejącego stanu wiedzy. Dlatego też uważam, że tematyka rozprawy doktorskiej
Pani mgr Aleksandry Walaszczyk dotycząca oceny aktywności przeciwgrzybowej wybranych
szczepów bakteryjnych z rodzaju *Bacillus* i *Pseudomonas* zdolnych do wytwarzania
biosurfaktantów, jak również analiza wpływu zanieczyszczeń antropogennych na ich
wytwarzanie doskonale wpisuje się w nurt tych badań.

Oceniana rozprawa doktorska została przygotowana w języku polskim i przedstawiona w formie obszernego maszynopisu obejmującego 247 stron, podzielonego na dwanaście rozdziałów, poprzedzonych wykazem stosowanych skrótów, spisem treści oraz wyszczególnieniem dwóch publikacji wchodzących w skład rozprawy. Układ rozprawy ma raczej charakter monografii, jakkolwiek włączenie treści artykułów w rozdziale przedstawiającym omówienie wyników sugeruje układ hybrydowy, co w moim odczuciu wprowadza trochę zamieszania. Pierwszy rozdział pracy to *Wprowadzenie*, w którym Doktorantka w sposób bardzo syntetyczny przedstawiła przegląd literatury, wprowadzając czytającego w tematykę badawczą (15 stron). Omówione zostały tutaj syntetyczne i biologiczne fungicydy, jak i drobnoustroje wspomagające wzrost i zdrowotność roślin, z wyszczególnieniem mechanizmów takiego działania. Autorka przedstawiła także bakterie z rodzaju *Bacillus* i *Pseudomonas* oraz rodzaje wytwarzanych przez nie biosurfaktantów. Ostatni podrozdział tej części to bieżące wyzwania w stosunku do biologicznych środków ochrony roślin, jakimi są ich interakcje z zanieczyszczeniami środowiskowymi. Ze względu na to, że podrozdział ten wskazuje na istotność prowadzonych badań w tym obszarze, powinien być bardziej rozbudowany.

W dalszej części Pani mgr Aleksandra Walaszczyk nakreśliła ogólny cel pracy badawczej, który obejmował ocenę wpływu wybranych zanieczyszczeń antropogenicznych na aktywność przeciwgrzybową ryzosferowych szczepów bakteryjnych z rodzaju *Bacillus* i *Pseudomonas*. Realizacja jego była możliwa poprzez założone cele szczegółowe, które obejmowały:

- identyfikację biosurfaktantów wydzielanych przez szczepy bakterii z rodzaju *Bacillus* i *Pseudomonas*,
- ocenę aktywności przeciwgrzybowej i wskazanie mechanizmów ograniczania wzrostu szczepów *Fusarium* przez bakterie z rodzaju *Bacillus* i *Pseudomonas*,
- charakterystykę wybranych szczepów pod kątem ich wpływu na kiełkowanie nasion i wzrost siewek ogórka siewnego,
- analizę wytwarzania biosurfaktantów w hodowlach mieszanych bakteryjno-grzybowych, jak i zawierających komórki dwóch różnych szczepów z rodzaju *Bacillus*,
- ocenę wzrostu bakterii, wytwarzania biosurfaktantów i aktywności przeciwgrzybowej w hodowlach bakterii z rodzaju *Bacillus* i *Pseudomonas* w obecności zanieczyszczeń środowiskowych,

- opracowanie podłoża wzrostowego dla wybranego szczepu bakteryjnego charakteryzującego się wysoką i stabilną aktywnością przeciwgrzybową oraz pozytywnym wpływem na kiełkowanie i wzrost siewek ogórka siewnego.

Rozdział trzeci to opis materiałów, a czwarty metod wykorzystywanych w badaniach (19 stron maszynopisu). Autorka w tej części opisała tylko te materiały i metody, które dotyczyły nieopublikowanej części pracy, z pozostałymi można było się zapoznać w załączonych artykułach. Zdecydowanie korzystniej, dla przejrzystości pracy, byłoby przedstawienie całej metodologii w tym miejscu, bez konieczności poszukiwania dodatkowych informacji w artykułach. Prace eksperymentalne zostały dobrze zaplanowane i zrealizowane, a dobór metod badawczych jest adekwatny do postawionego celu badawczego. Należy podkreślić szeroki wachlarz metod wykorzystanych przez Doktorantkę, w tym zaawansowanych metod analitycznych takich jak techniki MALDI-TOF/TOF oraz LC/MS/MS.

W dalszej części Doktorantka przedstawiła wyniki badań, rozdział ten stanowi najobszerniejszą część rozprawy doktorskiej i wskazuje na wieloaspektowe podejście Pani mgr Aleksandry Walaszczyk do założonego celu badawczego. Wyodrębniono w nim 10 podrozdziałów zawierających jeszcze dodatkowe podpunkty. Dwa z nich stanowią artykuły naukowe, które obejmują poszerzenie badań dla konkretnego układu badawczego. Uważam, że zdecydowanie korzystniej byłoby, gdyby w tym miejscu znalazły się komentarze do artykułów. Bardzo duża liczba uzyskanych wyników badań została przedstawiona w oparciu o 11 tabel i 45 rycin. Doktorantka w pierwszej części badań scharakteryzowała 80 ryzosferowych szczepów bakteryjnych pod kątem profilu wytwarzanych przez nie biosurfaktantów. Następnie oceniła aktywność przeciwgrzybową 75 z nich wobec szczepu *Fusarium sambucinum* IM 6525 oraz 22 szczepów *Bacillus* (wybrano tylko te szczepy, które wykazywały zdolność do kolonizacji strzępek grzybni) wobec szczepu *Fusarium culmorum* DSM 1094. W dalszym etapie badań określona została aktywność przeciwgrzybowa bakteryjnych organicznych związków lotnych (VOCs) wobec dwóch testowanych szczepów z rodzaju *Fusarium*. Przeprowadzona została także ocena wpływu szczepów bakteryjnych (32 szczepy) na wzrost korzeni siewek ogórka siewnego, identyfikacja genetyczna wybranych szczepów bakteryjnych oraz ocena wytwarzania cyklicznych lipopeptydów (cLP-Bc) przez szczepy *Bacillus* w płynnych hodowlach bakteryjno-grzybowych. Następnie Doktorantka dokonała oceny wpływu obecności zanieczyszczeń antropogenicznych, takich jak wybrane barwniki azowe, syntetyczne pestycydy i mikroplastik na wytwarzanie biosurfaktantów i aktywność przeciwgrzybową bakterii z rodzaju *Bacillus* i *Pseudomonas*. Jest to najobszerniejszy podrozdział tej części pracy. Następnie przeprowadzona została ocena wpływu dwóch fungicydów (azoksystrobiny

i propamokarbu HCl) na aktywność przeciwwgrzybową w płynnych hodowlach bakteryjno-grzybowych oraz wytwarzanie surfaktyny i ituryny w monokulturach i w hodowlach mieszanych. Przebadano także wpływ wybranych szczepów bakteryjnych z rodzaju *Bacillus* i *Pseudomonas*, jak i ich metabolitów na przepuszczalność błon grzybni, zmiany w jej lipidomie oraz kiełkowanie zarodników dwóch szczepów z rodzaju *Fusarium*. Doktorantka przeprowadziła także analizę aktywności przeciwwgrzybowej trzech szczepów z rodzaju *Bacillus* wobec grzybów *Fusarium* z wykorzystaniem nasion ogórka siewnego. Ostatni etap tej części pracy obejmował opracowanie podłoża wzrostowego zawierającego produkty uboczne przemysłu spożywczego do hodowli szczepu *Bacillus* sp. Kol B9. Kolejny rozdział to 30 stronicowa *Dyskusja* uzyskanych wyników badań, w której Doktorantka dokonała analizy i interpretacji uzyskanych przez nią wyników w odniesieniu do literatury światowej. Rozdział ten bardzo mi się podobał, dyskusja została przeprowadzona w sposób bardzo dojrzały i dowodzi przemyślanego doboru przeprowadzonych eksperymentów i zastosowanych metod badawczych, które pozwoliły na realizację założonego celu badawczego. Całość pracy wieńczą *Wnioski i stwierdzenia końcowe*, *Streszczenie* w języku polskim i angielskim, *Oświadczenia współautorów*, *Całkowity dorobek naukowy* oraz bogata *Bibliografia* (242 pozycje literaturowe), która dowodzi doskonałej znajomości tematu przez Doktorantkę.

Prace eksperymentalne przedstawione w rozprawie doktorskiej zostały dobrze zaplanowane i zrealizowane. Na szczególne podkreślenie zasługuje ogromna liczba przeprowadzonych eksperymentów oraz kompleksowe podejście do realizacji założonego celu pracy.

Do najważniejszych osiągnięć rozprawy doktorskiej można zaliczyć:

- wykazanie, że wśród testowanych szczepów z rodzaju *Bacillus* są takie, które mają zdolność do kolonizacji strzępek grzybni, jak również wykazują dodatkowy mechanizm działania przeciwwgrzybowego polegający na intensywnym, dendrytycznym wzroście, który uniemożliwia grzybni dalszą kolonizację,
- analiza i wskazanie szczepów bakterii zdolnych do wytwarzania znacznych ilości ituryny,
- wykazanie, że wysoka aktywność przeciwwgrzybowa testowanych szczepów bakteryjnych jest związana ze wzrostem przepuszczalności błon grzybni, w tym duże znaczenie biosurfaktantów wytwarzanych przez nie w procesie ograniczenia wzrostu grzybni,

- zaobserwowanie, że obecność i rodzaj zanieczyszczeń antropogenicznych w zróżnicowany sposób mogą wpływać na wytwarzanie biosurfaktantów przez testowane szczepy z rodzaju *Bacillus*, jak i ich aktywność przeciwgrzybową,
- wykazanie, że zaprawienie nasion ogórka siewnego szczególnie szczepem *Bacillus* sp. Kol B9 chroni nasiona i siewki ogórka przed niekorzystnym wpływem *Fusarium culmorum* DSM 1094
- wykazanie, że produkty uboczne z przemysłu spożywczego mogą być składnikiem ekologicznego podłoża zapewniającego intensywny wzrost szczepu *Bacillus* sp. Kol. B9.

Recenzowana praca zawiera ogromny materiał badawczy, a redakcja jej była z pewnością dużym wyzwaniem. Autorka nie uniknęła jednak błędów edytorskich, stylistycznych, czy niefortunnnych sformułowań (np. str. 12 „Z kolei biosurfaktanty zazwyczaj mają charakter anionowy lub neutralny” – w jakim kontekście neutralny?, np. str. 21 „...spadek intensywności...”, str. 66 „...spadek poziomu...” w różny sposób zapisywano w pracy wytwarzanie biosurfaktantów przez testowane szczepy – jako produkcja, intensywność produkcji, poziom), których znaczenie można jednak pominąć.

Jakkolwiek z obowiązku recenzenta pozwolę sobie na wskazanie kilku kwestii do dyskusji.

1. Co było przyczyną braku możliwości ustalenia przynależności gatunkowej niektórych z testowanych szczepów bakteryjnych?
2. Na stronie 82 Doktorantka przedstawiła wyniki degradacji dwóch syntetycznych herbicydów kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D) oraz metolachloru (MET) przez wybrane szczepy bakterii z rodzaju *Bacillus* – w jaki sposób przeprowadzono i oznaczono degradację?
3. Czy przeprowadzone badania posiadają aspekt aplikacyjny i co można powiedzieć o ocenie ekonomicznej takiego rozwiązania?
4. Na jakie obszary badań należałoby jeszcze zwrócić uwagę planując dalsze eksperymenty?

Przedstawione powyżej pytania i sugestie mają charakter dyskusyjny i nie obniżają mojej pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej.

Założony cel badawczy przez Panią mgr Aleksandrę Walaszczyk został osiągnięty, a recenzowana rozprawa doktorska zawiera oryginalny materiał badawczy, który z całą pewnością stanowi istotny wkład do aktualnego stanu wiedzy dotyczącej aktywności przeciwgrzybowej szczepów *Bacillus* i *Pseudomonas*, zdolnych do wtwarzania biosurfaktantów z grupy cyklicznych lipopeptydów, także w obecności zanieczyszczeń

antropogenicznych. Doktorantka wykazała się umiejętnością projektowania i prowadzenia prac badawczych dobierając we właściwy sposób metodykę badań, jak również w sposób poprawny potrafi interpretować uzyskane wyniki badań.

Oceniając całkowity dorobek Doktorantki należy wspomnieć, że jest ona współautorką czterech publikacji (w tym trzy indeksowane w JCR). Wyniki badań prezentowane były na konferencjach o zasięgu międzynarodowym (jedno wystąpienia ustne i trzy postery), jak i krajowym (dwa wystąpienia ustne i siedem posterów). Doktorantka odbyła dwa staże naukowe, co z całą pewnością pozwoliły na zdobycie przez nią cennego doświadczenia. Aktywnie włącza się także w działalność organizacyjną na Wydziale, jak i prace ze Studenckim Kołem Naukowym Biotechnologiczno-Mikrobiologicznym.

Podsumowując, w mojej ocenie, biorąc pod uwagę szeroki zakres prowadzonych badań oraz kompleksowe podejście do realizacji założonego celu badawczego, rozprawa doktorska mgr Aleksandry Walaszczyk w pełni odpowiada wymogom Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668) stawianym pracom doktorskim. W związku z tym zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie mgr Aleksandry Walaszczyk do dalszych etapów postępowania doktorskiego.