



Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr. Michała Pylaka,
pt.: „Opracowanie bakteryjnego kompleksu do naturalizacji ryzosfery malin”

1. Wprowadzenie

Recenzję wykonano na zlecenie Dyrektora Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN w Lublinie, prof. dr. hab. Cezarego Sławińskiego, czł. koresp. PAN. Stwierdzam, że otrzymany zestaw dokumentów jest kompletny i umożliwia ocenę, czy rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

2. Ocena wyboru problematyki badawczej

Zgodnie z wytycznymi Rady Unii Europejskiej wyzwaniem stawianym gospodarce rolniczej jest zapewnienie bezpieczeństwa żywnościowego przy jednoczesnym ograniczaniu negatywnego wpływu na środowisko przyrodnicze. Jest ono także jednym z wyzwań strategii Zielonego Ładu. Wymusza to zmiany w technologiach produkcji rolniczej i ogrodnictwa oraz poszukiwanie nowych innowacyjnych metod uprawy. Wykorzystywanie nowoczesnych metod biologii molekularnej w gospodarce wychodzi naprzeciw zapotrzebowaniu rolnictwa ekologicznego. Biopreparaty rolnicze oparte na postępie biologicznym mogą przyczynić się do ograniczenia niekorzystnego wpływu agrochemikaliów na jakość produktów pochodzenia rolniczego i zmniejszyć niekorzystne oddziaływanie rolnictwa na środowisko przyrodnicze.

Uwzględniając powyższe informacje można stwierdzić, że podjęta przez mgr. Michała Pylaka problematyka jest interesująca i aktualna, a wybór tematu rozprawy doktorskiej, pt.: „Opracowanie bakteryjnego kompleksu do naturalizacji ryzosfery malin” jest uzasadniony, zarówno z poznawczego, jak i użytecznego punktu widzenia. Tematyka podjęta przez Doktoranta wpisuje się w dyscyplinę rolnictwo i ogrodnictwo.

3. Ocena formalna

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr. Michała Pylaka wykonana została w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN w Lublinie. Funkcję promotora pełni prof. dr hab. Magdalena Frąc, a promotora pomocniczego dr Karolina Oszust. Badania zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach projektu „Nowe rozwiązania biotechnologiczne w diagnostyce, zwalczaniu i monitoringu kluczowych patogenów grzybowych w ekologicznej uprawie owoców miękkich” realizowanego w ramach strategicznego programu badań naukowych i prac rozwojowych BIOSTRATEG.

Mgr Michał Pylak, jako rozprawę doktorską, zgodnie z artykułem 187.3 ustawy oraz uchwałą nr 167/P16P2021 z dnia 9 grudnia 2021 r. Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN w Lublinie, przedstawił zbiór trzech opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych:

1. **Pylak, M.**, Oszust, K., Frąc M., 2019. Review report on the role of bioproducts, biopreparations, biostimulants and microbial inoculants in organic production of fruit. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 18, 597-616. (IF = **5,261**; 140 pkt).
2. **Pylak, M.**, Oszust, K., Frąc M., 2020. Searching for New Beneficial Bacterial Isolates of Wild Raspberries for Biocontrol of Phytopathogens-Antagonistic Properties and Functional Characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 9361. (IF = **5,924**; 140 pkt).
3. **Pylak, M.**, Oszust, K., Frąc M., 2021. Optimization of Growing Medium and Preservation Methods for Plant Beneficial Bacteria, and Formulating a Microbial Biopreparation for Raspberry Naturalization. *Agronomy*, 11, 2521. (IF = **3,949**; 100 pkt).

Zbiór wyżej wymienionych publikacji uzupełniają materiały niepublikowane autorstwa Michał Pylak, Karolina Oszust, Jacek Panek, Magdalena Frąc. Structural and functional shift of soil rhizosphere and raspberry shoots microbiomes underlying changes caused by phytopathogens contamination and naturalization strategies implementation.

Dwie z wyżej wymienionych publikacji to oryginalne prace twórcze wydane w *International Journal of Molecular Sciences* oraz *Agronomy*, a jedna jest pracą przeglądową, która jest bardzo dobrym uzupełnieniem oryginalnych prac twórczych. Została ona opublikowana w czasopiśmie *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. Według bazy Scopus publikacja ta jest już 48 krotnie cytowana. Publikacja przeglądowa pozwoliła udowodnić, że Doktorant, wykazał się ogólną wiedzę teoretyczną w reprezentowanej dyscyplinie. Sumaryczny *Impact Factor* zbioru publikacji wynosi 15,134, a suma punktów według MNiSW/MEiN – **380**. Są to zatem wskaźniki bardzo dobre i pośrednio dowodzą o

innowacyjności prowadzonych badań. Wszystkie prace są współautorskie, w których Doktorant jest pierwszym autorem. Fakt ten oraz dołączone oświadczenia wskazują, że Doktorant pełnił istotną rolę w przygotowaniu tych publikacji.

Rozprawa doktorska wraz z kopiami zbioru publikacji oraz manuskrytem nieopublikowanym z badań uzupełniających liczy 208 stron. W jej skład, poza wymienionymi opublikowanymi publikacjami i manuskrytem nieopublikowanym, wchodzi streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzenie, hipoteza badawcza i cele rozprawy doktorskiej, omówienie wyników przedstawionych w publikacjach i badaniach uzupełniających, podsumowanie i wnioski, bibliografia, oświadczenia oraz aneks – życiorys naukowy, który jest istotny dla dorobku naukowego, lecz nie wchodzi bezpośrednio w skład rozprawy doktorskiej.

Konkludując ocenę formalną stwierdzam, że cykl opublikowanych publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe mgr. Michała Pylaka spełnia wymagania stawiane przez obowiązujące prawo osobom ubiegającym się o stopień doktora. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że wyniki badań stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej ukazały się drukiem w renomowanych czasopismach zagranicznych.

4. Ocena merytoryczna

Tytuł ocenianej rozprawy doktorskiej jest precyzyjny i w pełni ujmuje jej treść, a uzyskane wyniki odpowiadają na cel badań. Rozprawę doktorską rozpoczynają streszczenia, w języku polskim i angielskim, które bardzo dobrze dokumentują zakres problematyki badawczej i przedstawiają syntezę uzyskanych wyników.

W pierwszym rozdziale dysertacji zatytułowanym „Wprowadzenie” Doktorant scharakteryzował ryzosferę oraz opisał wpływ pożytecznych mikroorganizmów na rośliny uprawne. Szczególną uwagę zwrócił na znaczenie preparatów mikrobiologicznych stosowanych w rolnictwie. Rozdział ten dobrze wprowadza czytelnika w badaną problematykę badawczą. W kolejnej części pracy przedstawiono hipotezy badawcze i cel rozprawy doktorskiej. Zostały one sformułowane poprawnie i wyznaczyły kierunek badań. Zrealizowanie celu rozprawy było możliwe dzięki dobremu opanowaniu przez Doktoranta bardzo szerokiego wachlarza technik badawczych począwszy od oznaczeń chemicznych i biochemicznych, a kończąc na analizach z zakresu mikrobiologii molekularnej i bioinformatyce.

W następnym rozdziale Doktorant opisał w sposób syntetyczny wyniki badań uzyskane i szczegółowo przedstawione w opublikowanych artykułach naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Doskonałą podbudową dla oryginalnych prac twórczych była publikacja przeglądowa, w której omówiono znaczenie rolnictwa ekologicznego, scharakteryzowano

komercyjne biopreparaty oraz komponenty wykorzystywane jako nośniki dla preparatów mikrobiologicznych, a także najczęściej wykorzystywane w biopreparatach inokulum mikrobiologiczne.

Celem badań publikacji P2 było wyizolowanie z próbek ryzosfery oraz korzeni malin dzikorosnących izolatów bakterii posiadających zdolność do hamowania wzrostu wybranych fitopatogenów owoców miękkich. W tym celu w pierwszym etapie z próbek ryzosfery i korzeni dzikich malin pochodzących z Nadleśnictwa Janów Lubelski, Kraśnik, Łuków, Puławy, Siedlce i Świdnik wyizolowano 65 różnych izolatów bakteryjnych należących do 21 rodzajów, a w drugim etapie wykonano badania przesiewowe izolatów pod kątem ich zdolności antagonistycznych wobec grzybów i patogenów grzybobodobnych, takich jak: *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp., *Phytophthora* spp. i *Verticillium* spp. Następnie wybrano osiem najskuteczniejszych antagonistów należących do *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Rhodococcus* genera i poddano je dalszym badaniom. Na podstawie analizy przeprowadzonej z wykorzystaniem pojemności metabolicznej i wrażliwości chemicznej oraz potencjału antagonistycznego wytypowano izolaty przydatne do konstrukcji biopreparatów wykorzystywanych w agroekologii.

Celem badań zaprezentowanych w publikacji P3 było opracowanie biopreparatu na bazie szczepów bakterii opisanych w publikacji P2. Proces optymalizacji podłoża hodowlanego koncentrował się na doborze nośnika szczepionki, źródła węgla i azotu oraz pH podłoża. Optymalizacja została przeprowadzona dla czterech środowiskowych izolatów bakterii należących do rodzajów *Arthrobacter*, *Pseudomonas* i *Rhodococcus*. W doświadczeniu wazonowym określono wpływ kultur bakteryjnych na wzrost pędów i korzeni roślin, aktywność enzymatyczną gleby oraz zawartość makroskładników w pędach roślin i zawartość przyswajalnego fosforu, potasu i magnezu oraz azotu mineralnego w glebie w zależności od strategii naturalizacji. Opis wyników zaprezentowanych w artykułach P2 i P3 podkreśla spójność publikacji wchodzących w skład rozprawy. Uwagę zwraca szeroki wachlarz zastosowanych metod zapewniający przeprowadzenie z sukcesem kompleksowych badań. Badania opisane w publikacjach P2 i P3 zostały wykonane nowoczesnymi technikami stosowanymi w mikrobiologii środowiskowej. Pozwoliło to na uzyskanie cennych i wiarygodnych wyników.

Kolejny rozdział rozprawy stanowi „Podsumowanie i wnioski”, w którym Doktorant w syntetyczny sposób przedstawił najważniejsze osiągnięcia uzyskane w swoich badaniach. Dalej znajdują się kopie opublikowanych artykułów wchodzących w skład zbioru publikacji i tekst manuskryptu P4, stanowiący materiał uzupełniający oraz spis literatury obejmujący 138 pozycji

naukowych. Ostatni rozdział rozprawy stanowią oświadczenia współautorów publikacji składający się na rozprawę doktorską oraz aneks – życiorys naukowy.

Reasumując ocenę merytoryczną stwierdzam, że publikacje składające się na rozprawę doktorską powstały na podbudowie dobrej koncepcji badań. Wykonane badania są nowatorskie i spójne z założeniami Europejskiego Zielonego Ładu. Doświadczenia opisane w publikacjach P2 i P3 zostały zaprojektowane logicznie i wykonane są prawidłowo pod względem metodycznym. Metody badawcze zostały trafnie dobrane i pozwoliły na weryfikację hipotez badawczych. Wyniki są starannie opracowane i dostosowane do wymagań czasopism. Trafne rozwiązania metodyczne czynią uzyskane rezultaty cennymi. Zostały one poprawnie opracowane statystycznie i dobrze zilustrowane. Doktorant udowodnił, że posiada ogólną wiedzę teoretyczną do właściwej oceny otrzymanych wyników badań. Nabył też umiejętność syntetycznego opisu problematyki badawczej zaprezentowanej w zbiorze publikacji, przedstawionych jako rozprawa doktorska. Badania wykonane przez Doktoranta mają duże znaczenie aplikacyjne i odpowiadają na aktualne potrzeby rolnictwa.

4.1. Najważniejsze osiągnięcia

Oryginalna koncepcja oraz szeroki wachlarz precyzyjnych metod badawczych i odpowiednie przygotowanie Doktoranta umożliwiło osiągnięcie wielu cennych i wartościowych wyników. Do najważniejszych z nich zaliczam:

1. Wyizolowanie 4 szczepów bakterii (*Rhodococcus* sp. B12/18, *Pseudomonas* sp. B37/18, *Arthrobacter* sp. B58/18, *Rhodococcus* sp. B75/18) z korzeni malin dzikorosnących posiadających właściwości hamujące wzrost najbardziej powszechnych patogenów grzybowych oraz grzybopodobnych atakujących uprawy malin.
2. Optymalizacja składu podłoża hodowlanego i opracowanie składu mieszanki suplementacyjnej wspomagającej wzrost wyizolowanych bakterii.
3. Wykazanie, że ryzosfery malin leśnych może być wartościowym i bogatym źródłem pożytecznych bakterii.
4. Stwierdzenie, że bakterie wyizolowane z ryzosfery malin mają właściwości antagonistyczne wobec powszechnych patogenów roślin, takich jak *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp., *Phytophthora* spp. i *Verticillium* spp.
5. Stwierdzenie, że naturalizacja poprzez podlewanie inokulum bakteryjnym malin powoduje biostymulację wzrostu roślin skażonych patogenami.

Oceniając zbiór 3 opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych oraz ich opis, stwierdzam, że Pan mgr Michał Pylaka wykazał się wiedzą teoretyczną w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo, posiadał umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w zakresie zastosowania własnych badań naukowych w sferze gospodarczej. Publikacje oryginalne są spójne. Dlatego też całość dowodzi, że ich zbiór wzajemnie się uzupełnia.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska stanowi oryginalne osiągnięcie naukowe i wnosi do literatury przedmiotu wiele istotnych informacji poszerzających stan wiedzy w zakresie możliwości selekcji efektywnych bakterii przydatnych w promowaniu wzrostu roślin oraz konstrukcji bakteryjnego kompleksu do naturalizacji ryzosfery malin.

5. Uwagi krytyczne i dyskusja

Uważam, że w przypadku gdy rozprawę doktorską stanowi zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych i dołącza się do niego opis, to w opracowaniu takim powinien być wyodrębniony rozdział metodyka. Opis metodyki badań mógłby być wtedy syntetyczny i wspólny dla wszystkich artykułów naukowych. Ponadto opis artykułów naukowych powinien być przedstawiony według jednakowej koncepcji. W obecnej formie opracowania zbyt dużo uwagi poświęcono badaniom uzupełniającym, a ich opis posiada inną strukturę niż opis artykułów P1 – P3. Szkoda również, że badania przedstawione w materiale uzupełniającym (P4) nie zostały opublikowane, gdyż wyniki w nim zawarte są cenne i nowatorskie. Uzupełniają one wiedzę zawartą w publikacjach P1 - P3 w zakresie zmian strukturalnych i funkcjonalnych zachodzących w zbiorowiskach mikroorganizmów zasiedlających ryzosferę i fyllosferę malin zainfekowanych przez fitopatogeny oraz w zakresie aplikacji inokulum bakterii wspomagających wzrost roślin. Analizując poszczególne rozdziały rozprawy doktorskiej nasuwają się następujące pytania:

1. Która z zastosowanych technik badawczych jest najefektywniejsza w konstrukcji inokulum bakterii mogących mieć zastosowanie w rolnictwie ekologicznym.
2. Czy zasadne jest wyodrębnianie dwóch ostatnich hipotez badawczych jako dwie oddzielne. Wydaje mi się, że można je połączyć w jedną.
3. Czym różni się używane przez Pana pojęcie naturalizacji od bioaugmentacji.

6. Ocena końcowa

Reasumując stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr. Michała Pylaka, pt.: „Opracowanie bakteryjnego kompleksu do naturalizacji ryzosfery malin” spełnia warunki

stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. 2018 poz. 1668 ze zm.).

Zatem wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN w Lublinie o dopuszczenie mgr Michała Pylaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę:

- 1) wysoką wartość poznawczą rozprawy doktorskiej,
- 2) aktualność podjętej problematyki badawczej,
- 3) umiejętne wykorzystanie nowoczesnych technik badawczych,
- 4) opublikowanie zbioru publikacji w renomowanych międzynarodowych czasopismach naukowych

wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr. Michała Pylaka stosowną nagrodą.

Olsztyn, 15.11.2022 r.



