



Lublin, 12.11.2022 r.

dr hab. Jolanta Jaroszuk-Ścisiel, prof. UMCS
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej
Instytut Nauk Biologicznych
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
jolanta.jaroszuk-scisiel@mail.umcs.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. inż. Michała Pylaka pt. "Opracowanie bakteryjnego kompleksu do naturalizacji ryzosfery malin"

Rozprawa doktorska **mgr. inż. Michała Pylaka** została przygotowana w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem Promotora prof. dr hab. Magdaleny Frąc oraz Promotora pomocniczego: dr Karoliny Oszust

Uzasadnienie wykonania recenzji

Recenzja została wykonana na podstawie uchwały nr 209/P22/2022 Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN z dnia 12 września 2022 r. w sprawie wyznaczenia recenzentów rozprawy doktorskiej podpisanej przez Przewodniczącego Rady Prof. dr hab. Wiesława Oleszka oraz powiadomienia podpisanego 19 września 2022 r. przez Dyrektora Prof. dr hab. Cezarego Słotwińskiego informującego o powołaniu na funkcję recenzenta w postępowaniu w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo wszczętego na wniosek mgr. inż. Michała Pylaka.

Struktura rozprawy doktorskiej – ocena formalna

Podstawę ocenianej rozprawy doktorskiej stanowi **cykl trzech publikacji** (autorstwa Pylak, Oszust i Frąc), które ukazały się w latach 2019-2021 w trzech wysoko punktowanych (suma IF=15,134, suma punktacji MNiSW=380, średni IF=5,045, średnia punktacja MNiSW=126,67) czasopismach z listy JCR: (1) *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, IF=5,261, punktacja MNiSW=140 (2019. Review report on the role of bioproducts, biopreparations, biostimulants and microbial inoculants in organic production of fruit), (2) *International Journal of Molecular Sciences*, IF=5,924, punktacja MNiSW=140 (2020. Searching for new beneficial bacterial isolates of wild raspberries for biocontrol of phytopathogens-antagonistic properties and functional characterization) oraz (3) *Agronomy*, IF=3,949, punktacja MNiSW=100 (2021.



Optimization of growing medium and preservation methods for plant beneficial bacteria, and formulating a microbial biopreparation for raspberry naturalization).

Autor włączył do cyklu **przygotowany do publikacji manuskrypt** autorstwa Pylak, Oszust, Panek i Frąc pt. "Structural and functional shift of soil rhizosphere and raspberry shoots microbiomes underlying changes caused by phytopathogens contamination and naturalization strategies implementation" zawierający opis analiz zmian strukturalnych i funkcjonalnych w zbiorowiskach mikroorganizmów zasiedlających ryzosferę i fyllosferę malin oraz sposobu aplikacji wyselekcjonowanych bakterii.

We wszystkich publikacjach i manuskrypcie Doktorant jest pierwszym autorem i miał wiodący udział w ich przygotowaniu, wykonaniu badań oraz analizie, statystycznym opracowaniu i graficznym opracowaniu wyników, co wynika z opisu wkładu własnego zamieszczonego wraz z listą publikacji na początku tekstu rozprawy doktorskiej oraz oświadczeń zamieszczonych jako odrębny rozdział (nr 10) rozprawy.

Badania opisane w cyklu publikacji i manuskrypcie zostały **przeprowadzone w ramach projektu** „Nowe rozwiązania biotechnologiczne w diagnostyce, zwalczaniu i monitoringu kluczowych patogenów grzybowych w ekologicznej uprawie owoców miękkich” finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach strategicznego programu badań naukowych i prac rozwojowych BIOSTRATEG.

Rozprawa doktorska została bardzo starannie przygotowana w postaci złożonego z **11 rozdziałów 208 stronicowego opracowania** poprzedzonego streszczeniem w języku polskim i abstraktem w języku angielskim oraz listą publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej. W kolejnych rozdziałach przedstawione zostały: (1) Wprowadzenie, (2) Hipoteza badawcza i cele rozprawy doktorskiej, (3) Omówienie wyników przedstawionych w publikacjach i manuskrypcie poprzedzone wstępem i opisem użytych materiałów i metod, (4) Podsumowanie i wnioski, (5, 6, 7, 8) teksty kolejnych publikacji (P1, P2, P3) i manuskryptu, (9) Bibliografia, (10) Oświadczenia oraz (11) Aneks-Życiorys naukowy.

Bibliografia rozprawy doktorskiej mgr. inż. Michał Pylak zawiera 138 wyłącznie angielskojęzycznych publikacji, a w poszczególnych publikacjach Autor odwołuje się do łącznie aż 338 publikacji: 154 (w przeglądowej publikacji P1), 70 (P2), 63 (P3), 51 (manuskrypt).

Pod względem formalnym bardzo wysoko oceniam przygotowanie rozprawy doktorskiej.

Ocena podjętej tematyki badawczej

Do najważniejszych współczesnych wyzwań należy opracowanie i wprowadzenie nowatorskich, zrównoważonych i proekologicznych praktyk rolniczych, które pozwolą ograniczyć negatywny wpływ rolnictwa na ekosystem i dostosować nowoczesne rolnictwo do nowych uwarunkowań legislacyjnych i warunków klimatycznych.

Recenzowana rozprawa doktorska mgr. inż. Michała Pylaka jest doskonałym przykładem właściwego podejścia do tego wyzwania.

Zwiększona, co najmniej dwukrotnie, w ubiegłym dziesięcioleciu produkcja ekologiczna owoców miękkich wymaga wypracowania niezwykle skutecznych metod zapewniających



wysoki poziom plonowania porównywalny z plonowaniem w rolnictwie konwencjonalnym. Przy tym konieczne jest ograniczenie stosowania chemicznych środków ochrony roślin oraz nadmiernego nawożenia roślin, co jest głównym wymogiem kształtowania zrównoważonego rolnictwa zawartym m.in. w rozporządzeniu Rady Unii Europejskiej z 2007 r.

Zielony Ład, którego elementem jest *Strategia na Rzecz Bioróżnorodności* wprowadzona 20.05.20 r. zakłada objęcie uprawami ekologicznymi 25% powierzchni gruntów uprawnych oraz zmniejszenie stosowania pestycydów o 50%, co dokonane ma być do 2030 r. Zatem nowoczesne rolnictwo musi być nie tylko skuteczne i ekonomicznie uzasadnione, ale także oparte na biologicznych metodach podnoszących odporność roślin oraz podwyższających poziom ich plonowania a także poprawiających parametry abiotyczne i biotyczne gleb uprawnych.

Rozprawa doktorska wpisuje się w dwa spośród dziesięciu priorytetów dążących do przywrócenia i zachowania bioróżnorodności określonych przez Unię Europejską: (1) *Ekosystemy i bioróżnorodność* oraz (2) *Zdrowa żywność i zrównoważone rolnictwo*.

Znaczenie podjęcia przez Doktoranta badań z tej bardzo aktualnej i wymagającej natychmiastowych i skutecznych rozwiązań tematyki jest ogromne i stwarza nadzieję na poszerzenie wiedzy teoretycznej oraz opracowanie metodyki jak i preparatów, które znajdą powszechne zastosowanie. Podjęta tematyka doskonale wpisuje się w dziedzinę nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

Analiza merytoryczna rozprawy doktorskiej

Ocenianą rozprawę doktorską mgr. inż. Michała Pylaka cechuje bardzo szerokie spojrzenie na sprawę kształtowania zrównoważonego rolnictwa, w szczególności ekologicznego i tzw. regeneracyjnego, opartego na stosowaniu skutecznych biopreparatów odznaczających się zdolnościami stymulacji wzrostu i ochrony roślin przed fitopatogenami jak również regeneracji i remediacji gleb zdegradowanych i zanieczyszczonych a jednocześnie sprawdzonych pod względem bezpieczeństwa ich stosowania dla stanu różnorodności i aktywności metabolicznej mikrobioty ryzosfery i fyllosfery roślin, czyli zapewnienia stabilności bioróżnorodności a najlepiej jej zwiększenia.

Rozprawa doktorska wniosła nowe pojęcia i nadała też nową jakość badaniom nad biopreparatami stosowanymi w rolnictwie. Bardzo cenne, porządkujące rozległą wiedzę na temat nowoczesnych metod biologicznej ochrony oraz bionawożenia jak również uwarunkowań legislacyjnych są zastosowane w rozprawie nowatorskie pojęcia odpowiadające innowacyjnym zabiegom: (1) *naturalizacja*, czyli przywrócenie stanu mikrobiomu właściwemu danej roślinie oraz (2) *regeneracja*, czyli inaczej remediacja gleb w szerszym kompleksowym ujęciu.

Preparaty nowoczesnego rolnictwa służyć mają nie tylko do biostymulacji i bioochrony roślin ale też do bioregeneracji, czyli bioremediacji gleb zdegradowanych umożliwiając przywrócenie do rolniczego wykorzystania ogromnego arealu gleb zanieczyszczonych różnorodnymi ksenobiotykami takimi jak węglowodory ropopochodne i metale ciężkie czy gleb przesuszonych i zasolonych.

Gleby zanieczyszczone metalami ciężkimi mogą być regenerowane, jak podał Doktorant w rozprawie, przy udziale mikroorganizmów wytwarzających metabolity takie, jak: peptydy,



siderofory, biosurfaktanty, egzopolimery, kwasy organiczne. Gleby zasolone, w których nagromadzają się reaktywne formy tlenu mogą regenerować mikroorganizmy wytwarzające enzymy katalazę i peroksydazę askorbinianową. W glebach przesuszonych poprawienie zdolności pobierania wody przez rośliny następuje dzięki stymulacji wzrostu korzeni oraz tworzenie przez mikroorganizmy substancji osmotycznie czynnych (prolina, betaina, glicyna, mannitol) pozwalających zachować turgor komórek w warunkach ograniczonego dostępu do wody.

Wielką zaletą rozprawy doktorskiej mgr. inż. Michała Pylaka jest to, że została ona oparta na innowacyjnych założeniach: (1) Pierwszym z nich jest pomysł stworzenia nowego preparatu biologicznej ochrony malin i stymulacji ich wzrostu w postaci kompleksu mikroorganizmów wyizolowanych i wyselekcjonowanych z ryzosferowy dzikorosnących, leśnych malin, czyli o działaniu polegającym na przeprowadzeniu zabiegu naturalizacji, (2) Drugim, bardzo ważnym punktem decydującym o sukcesie przedstawicieli mikrobioty ryzosferowej dzikorosnących malin w ochronie malin uprawnych, był odpowiedni dobór badań przesiewowych służących do wyłonienia najlepszych kandydatów na aktywne biologiczne składniki biopreparatów ochronnych obejmujących określenie aktywności antygrzybowej a jednocześnie zdolności wspomagania wzrostu roślin.

W rozprawie postawiono bardzo ciekawą hipotezę, że ryzosfera dzikorosnących malin dostarczy izolatów, które użyte do inokulacji malin uprawnych poprawią wzrost, aktywność mikroorganizmów glebowych w obecności fitopatogenów grzybowych i grzybopodobnych oraz bioróżnorodność i aktywność mikroorganizmów zasiedlających ryzosferę i fyllosferę roślin. W oparciu o tę hipotezę **opracowano bardzo szczegółowe cele cząstkowe,** które ukierunkowały badania według bardzo dobrego planu działania, który pozwolił na przeprowadzenie kolejnych etapów prac nad izolacją i selekcją najlepszych kandydatów na składniki czynne preparatu, czyli badaniem odpowiednich cech tych izolatów, opracowaniem metod namnażania i przechowywania oraz inokulacji roślin. Wpływ aplikacji inokulum izolatów z ryzosfery dzikorosnących malin badano określając parametry wzrostu roślin: mokrej masy korzeni i suchej masy części nadziemnych malin oraz aktywność biologiczną gleby ryzosferowej w oparciu o oznaczenie aktywności dehydrogenaz i określenie bioróżnorodności mikrobioty ryzosfery i fyllosfery malin.

Rozprawa doktorska jest przykładem niezwykle umiejętnego i nowoczesnego wykorzystania różnorodnych metod koniecznych do realizacji założeń i celów, co wymagało połączenia zróżnicowanych dziedzin mikrobiologii, genetyki, biochemii, fizjologii roślin, ekologii i nauk rolniczych.

Zwraca uwagę wielka systematyczność publikowania prac, począwszy od obszernej publikacji przeglądowej (P1) stanowiącej podstawę teoretyczną i metodyczną do opracowania właściwych założeń i planu przeprowadzania badań jak również tempo wykonywania doświadczeń, uzyskiwania i opracowywania wyników oraz przygotowywania publikacji doświadczalnych (P2, P3) i manuskryptu opisującego wpływ preparatu i metod naturalizacji na mikrobiotę ryzosfery i części nadziemnych (fyllosfery) malin.



Autor zamieścił w Rozprawie doktorskiej bardzo dobrze opracowane streszczenie całej rozprawy oraz opis doświadczeń i wyników przedstawionych dokładnie w kolejnych publikacjach.

Zakres badań wykonanych przez Doktoranta, jak wynika z oświadczeń przedstawionych w rozprawie, jest bardzo szeroki i obejmuje przeprowadzenie izolacji szczepów, zbadanie ich właściwości antagonistycznych, przeprowadzenie optymalizacji warunków hodowli i przechowywania, zaprojektowanie i przeprowadzenie doświadczenia wazonowego, określenie stanu mikrobioty ryzosfery i części nadziemnych malin.

Pierwsza (P1) publikacja składająca się na cykl będący podstawą rozprawy jest pracą przeglądową eksponująca problemy stojące na drodze nowoczesnego rolnictwa organicznego i ekologicznego. Przedstawia ona rozwiązania, które mogłyby zapewnić plonowanie i ekonomiczny rachunek równoważny rolnictwu konwencjonalnemu oraz dostosowanie zakresu bioproduktów stosowanych w rolnictwie ekologicznym do regulacji Komisji Europejskiej. Wśród zalecanych bioproduktów znalazły się preparaty oparte na różnorodnych źródłach zwierzęcych, roślinnych, w tym glonach należących zarówno do królestw Protista jak i roślin, a w szczególności na mikroorganizmach – bakteriach i grzybach, w tym m.in. bakteriach fermentacji mlekowej LAB (jak *Lactobacillus plantarum* PM411 zwalczających fitopatogeniczną bakterię *Xanthomonas fragariae*) i grzybach mykoryzy arbuskularnej zawartych w wielu preparatach biologicznej ochrony oraz biostymulujących. Publikacja ta zawiera doskonałą analizę kierunków i tempa rozwoju rolnictwa organicznego oraz przegląd typów bioproduktów, ze wskazaniem ich składu, sposobów udoskonalania ich skuteczności związanych z namnażaniem, przechowywaniem oraz miejscem, czasem, częstotliwością i formą wprowadzania preparatów na rośliny jak również szansami na sukces rynkowy i ekonomiczny. Publikacja przeglądowa stanowi świetny punkt wyjścia do planowania badań nad pozyskiwaniem biopreparatu bakteryjnego do ochrony owoców uprawianych w ekologicznym rolnictwie. W publikacji tej silniej mógłby być wyeksponowany mechanizm indukowania odporności roślin przez czynniki biotyczne zawarte w wielu biopreparatach opartych na opisanych w pracy mikroorganizmach (np. *Aureobasidium pullulans*, *Trichoderma*), czy na elicytorach odporności roślin pochodzenia roślinnego i/lub grzybowego np. chitozan czy wyciągów z roślin np. grejpfruta, jak również możliwość łączenia w jednym preparacie mikroorganizmów i elicytorów abiotycznych. Znaczenie tego mechanizmu Doktorant mocno podkreśla w opisie publikacji zawartym w rozprawie doktorskiej.

Poszukiwanie skutecznego w ochronie przed fitopatogenami kompleksu bakteryjnego oparto na badaniu tego efektu w stosunku do wybranych grzybowych i grzybopodobnych fitopatogenicznych szczepów. Wobec tych szczepów testowane były nie tylko aktywności antygrzybowe ale także przeprowadzona została ich analiza funkcjonalna. Testowano łącznie 12 szczepów po 3 szczepy z 4 odrębnych rodzajów: 3 rodzajów należących do królestwa Grzybów i 1 rodzaju (*Phytophthora*) z królestwa Chromista (grzybopływki), typ Oomycota (łęgnowce), rodzina *Peronosporae* (Wroślikowate). Wszystkie testowane szczepy grzybowych patogenów reprezentowały typ Ascomycota (workowce): *Botrytis* (gatunek *B. cinerea*) klasy *Leotiomycetes*, rzędu *Helotiales*, rodziny *Sclerotiniaceae* oraz 2 rodzaje z klasy *Sordariomycetes* i rzędu



Glomeralles należące do dwóch odrębnych rodzin: *Glomerellaceae* - *Colletotrichum* (gatunek *C. acutatum*) i *Plectosphaerellaceae* *Verticillium* sp.

Uważam, że fitopatogeniczne szczepy zostały trafnie wybrane, gdyż stanowią rzeczywiście główne zagrożenie epidemiologiczne w uprawie malin i reprezentują zróżnicowane systematycznie rodzaje, czym Doktorant powinien się pochwalić przybliżając charakterystykę przynależności systematycznej testowanych szczepów w publikacjach i rozprawie.

Czy Doktorant dostrzega też inne, być może większe, zagrożenia ze strony fitopatogenicznych grzybów jak i patogenicznych dla malin bakterii?

W publikacjach i we wprowadzeniu rozprawy doktorskiej wymieniono bardzo szeroki zakres związków takich, jak antybiotyki, endotoksyny, bakteriocyny, siderofory, enzymy hydrolityczne, cyjanowodór, kwas fenazy-1-karboksylowy (PCA), 2,4-DAPG, wytwarzanych przez bakterie ryzosferowe ograniczających wzrost organizmów fitopatogenicznych i rozwój chorób wywoływanych przez fitopatogeny. Opis ten wskazuje na bardzo dobre opanowanie przez Doktoranta podstaw teoretycznych bezpośrednich mechanizmów działania biopestycydów.

W zdaniu (na stronie 17) dotyczącym czynników ograniczających wirulencję fitopatogenów obok bardzo silnie działających degradująco na ściany grzybów patogenicznych enzymów chitynolitycznych wymienione zostały enzymy pektynolityczne. Najprawdopodobniej w tym zdaniu aktywność pektynolityczną, która powodując degradację pektyn i rozluźniając strukturę roślinnych ścian komórkowych ułatwia patogenem penetrację tkanek roślin, umieszczono pomyłkowo zamiast proteolitycznej i glukanolitycznej.

Charakterystykę funkcjonalną i określenie zdolności katabolicznych pojedynczych izolatów wykonano przy użyciu mikromacierzy fenotypowych na płytkach GEN III z wykorzystaniem systemu BIOLOG™. Płytki GEN III pozwoliły zbadać zdolność wykorzystywania 71 źródeł węgla należących do 6 grup: aminokwasów, peptydów i polipeptydów, kwasów karboksylowych i estrów, węglowodanów, polioli, kwasów cukrowych i ich związków, pochodnych cukrów. Na podkreślenie zasługuje też wykorzystanie płytek Gen III jako bardzo dobrego narzędzia do badania wpływu na testowane izolaty bakteryjne 23 stresowych czynników abiotycznych m.in. takich, jak zasolenie, skrajne wartości pH czy obecność antybiotyków. Zestawiając otrzymane wyniki za pomocą narzędzia statystycznego - analizy skupień i ich zobrazowania w formie dendrogramu stwierdzono różnice wzrostu badanych szczepów w obecności czynników stresowych oraz utworzenie 3 klastrow o podobnym profilu metabolicznym. Szczep *Rhodococcus* sp. B12/18 oraz dwa szczepy *Arthrobacter* sp. (B49/18 i B58/18), charakteryzowały się bardzo niską opornością na większość czynników ograniczających wzrost.

Testy API ZYM pozwoliły zbadać 19 różnych uzdolnień enzymatycznych i różnic metabolicznych. Izolat *Pseudomonas* sp. B37/18 charakteryzował się najszerszym zakresem zdolności metabolicznych a szczepy *Arthrobacter* sp. B58/18 i *Rhodococcus* sp. B12/18 charakteryzowały się najwyższą aktywnością enzymatyczną. Ponadto dla badanych izolatów określono w testach przesiewowych płytkowych oraz probówkowych takie aktywności, jak: denitryfikacja, nityfikacja, amonifikacja (uwalnianie jonów amonowych na podłożu mlekowym



i moczniowym, czyli raczej proteoliza i ureoliza), proteoliza, celuloza, wiązanie N, rozpuszczanie fosforanów.

W badaniach duży nacisk położono na optymalizację hodowli wybranych izolatów poprzez dobranie składu podłoża hodowlanego (źródeł węgla i azotu i ich stężeń), warunków hodowli (wartość pH podłoża i temperatura hodowli) a także metod zabezpieczenia aktywności i stabilności cech podczas przechowywania i poddawania procesom suszenia próżniowego i liofilizacji. W bardzo nowatorski sposób opracowano prebiotyczną mieszankę suplementacyjną wspomagającą wzrost wybranych szczepów opierając jej skład na wnikliwej analizie zdolności izolatów do wykorzystywania różnorodnych substratów. Proces optymalizacji wzrostu przeprowadzono uwzględniając 3 cukry w 3 stężeniach, 4 źródła N w 3 stężeniach, co pozwoliło wybrać sacharozę w stężeniu 3% oraz azotan amonu w stężeniu 6%, temperaturę w zakresie 24°C-30°C oraz wartości pH w zakresie 7-8 jako optymalne parametry wzrostu.

Sprawdzano także trzy metody zabezpieczania właściwości izolatów podczas przechowywania testując aż 18 wersji: suszenie konwencjonalne, suszenie próżniowe, liofilizację, przy czym uwzględniono dodatek 0,1 M trehalozy oraz ziemi krzemkowej. Przetestowano też 3 różne metody przygotowania próbki przez suszenie: (1) peletu bakteryjnego po odwirowaniu i usunięciu supernatantu, (2) całego podłoża hodowlanego wraz z mikroorganizmami oraz (3) podłoża hodowlanego wraz z mikroorganizmami na ziemi krzemkowej. Za optymalną metodę uznano suszenie próżniowe z dodatkiem 0,1 M trehalozy do podłoża hodowlanego.

Doświadczenia wazonowe były ukoronowaniem badań izolacyjnych i przesiewowych, w których w testach *in vitro* wybrano cztery szczepy bakteryjne należące do rodzajów *Arthrobacter*, *Pseudomonas* i *Rhodococcus*. Wybrane szczepy zostały przetestowane *in vivo* w dwumiesięcznych doświadczeniach wazonowych w celu określenia zarówno skuteczności promowania wzrostu roślin jak też ochrony roślin przed czterema rodzajami grzybowych i grzybopodobnych fitopatogenów ale także wpływu tych izolatów na bioróżnorodność zbiorowisk mikroorganizmów ryzosfery i fyllosfery malin. W doświadczeniach wazonowych przeprowadzonych w kontrolowanych warunkach fitotronowych (2-miesięczny okres uprawy, fotoperiod 16h dzień/8h noc, temperatura 20-22°C, stała wilgotność gleby) zastosowano 3 sposoby aplikacji równocennego w składzie i ilości inokulum bakteryjnego - po 2,5 ml zawiesiny każdego szczepu, czyli razem 10 ml o gęstości 10^8 komórek ml^{-1} na jedną donicę wypełnioną 3 kg gleby (pobraną z wierzchniej warstwy uprawy połowej malin). Opracowano zarówno formulację jak i sposoby wprowadzania biopreparatu na rośliny, czyli metodę naturalizacji. Przetestowano aplikację inokulum kompleksu bakteryjnego z zastosowaniem trzech metod: (1-R) na korzenie podczas wysadzania siewek malin odmiany *Polana*, (2-W) poprzez podlewanie w 4. tygodniu po posadzeniu siewek oraz (3-RW) poprzez połączenie tych dwóch powyższych sposobów aplikacji.

Zastosowano 5 patosystemów inokulum grzybowych i grzybopodobnych fitopatogenów (4 szczepy pojedynczo oraz w mieszanina 4 szczepów) przeprowadzając inokulację zawiesiną równoważną zawiesinie komórek bakterii, czyli o gęstości 10^8 konidii odpowiedniego patogena



ml⁻¹ w objętości 10 ml przy wprowadzaniu jednego szczepu fitopatogena lub 2,5 ml zawiesiny, gdy patogeny były stosowane w mieszaninie 4 szczepów.

Czym kierowano się przy doborze gleby do doświadczeń? Do jakiego typu należała ta gleba, jaki był jej skład granulometryczny i zawartość węgla? Czy rozważano zastosowanie innych wielkości inokulum konsorcjum bakteryjnego przewyższające inokulum grzybowe? Czy w świetle uzyskanych wyników Doktorant zalecałby wprowadzenie inokulum bakterii i grzybów w innej gęstości i w inny sposób?

Niezwykle ważny jest główny wniosek dotyczący badań wazonowych zamieszczony w rozprawie, że inokulum naturalizacyjne działa stymulująco zarówno na rośliny zainfekowane przez fitopatogeny jak i stymulująco na zbiorowiska mikroorganizmów ryzosfery i fyllosfery roślin.

Aplikacja inokulum mikrobiologicznego przez podlewanie 4 tygodnie po posadzeniu roślin skutkowała największym pozytywnym wpływem na suchą masę łodyg malin w przypadku inokulacji wszystkimi testowanymi patogenami oraz inokulowanych pojedynczym patogenem z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum* i *Phytophthora*. Efekt ten w przypadku pomiaru świeżej masy korzeni widoczny był tylko przy inokulacji *Vericillum*.

Bardzo ważnym osiągnięciem rozprawy doktorskiej jest uzyskanie istotnego efektu ochronnego zastosowanego do naturalizacji kompleksu bakteryjnego w warunkach obecności testowanych fitopatogenów. Natomiast w nieobecności patogenów zanotowano spadek biomasy korzeni i części nadziemnych, czyli konsorcjum nie spełniało funkcji stymulacyjnych w warunkach braku zagrożenia infekcją, chociaż przy aplikacji na korzenie w tych warunkach stwierdzono największą zawartość makroskładników w częściach nadziemnych.

Spostrzeżenie, że wprowadzenie inokulum bakteryjnego w celu naturalizacji roślin daje inny efekt w nieobecności fitopatogenów grzybowych niż w ich obecności jest bardzo cenne. Uważam, że wskazanie tak odmiennego oddziaływania preparatu naturalizującego jest bardzo ważnym odkryciem.

Jak według Doktoranta należy tłumaczyć ten odmienny efekt w warunkach obecności i nieobecności patogenów?

Kolejnym niezwykle ważnym wnioskiem było stwierdzenie, że strategia naturalizacji musi być dostosowana do konkretnych fitopatogenów, przed którymi metoda naturalizacji ma chronić określone rośliny uprawne w danej lokalizacji i w warunkach, czyli zauważenie konieczności bardzo indywidualnego dobierania metod ochrony i stymulacji roślin.

Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt dwukierunkowego spojrzenia na zagadnienie testowania i stosowania preparatów bakteryjnych. Szeroko zakrojone badania pozwoliły dostrzec bardzo ważne zależności wynikające nie tylko z inokulacji wybranymi szczepami bakteryjnym ale jednocześnie fitopatogenicznymi szczepami grzybowymi.

Podkreślono też, że inokulacja odmiennie wpływa na różne parametry wzrostu roślin, czyli części podziemne i nadziemne. Te różnice zostały dokładnie zaprezentowane w publikacji P3 a istotność wyników podkreślono nie tylko nanosząc słupki odchyłeń standardowych



ale przede wszystkim literowe oznaczenia istotności obliczone za pomocą analizy wariancji ANOVA dla wszystkich wyników mas korzeni i łodyg.

Wielką zasługą ocenianej rozprawy doktorskiej mgr. inż. Michała Pylaka jest **wskazanie na nowe funkcje znanych już narzędzi** wykorzystywanych w badaniach biochemicznych, w których określono aktywność dehydrogenazy w glebie ryzosferowej oraz w badaniach ekofizjologicznych przeprowadzonych za pomocą testów wykorzystania substratów na płytkach Biolog.

Do nowatorskich a wręcz przełomowych należy zaliczyć spostrzeżenie, że wprowadzenie kompleksu bakteryjnego wpłynęło korzystnie na aktywność dehydrogenazy w próbach bez inokulacji patogenami a nie w tych, które były inokulowane patogenem. Ten bardzo ciekawy wynik aktywności dehydrogenaz, jaki Doktorant uzyskał w swojej rozprawie, wskazuje na możliwość nowatorskiego wykorzystania analizy określania aktywności dehydrogenazy do rozróżnienia prób gleb ryzosferowych z nieobecnością i obecnością fitopatogenów, czyli narzędzia do badania oddziaływania fitopatogenów na roślinę jako nowej funkcji standardowej uniwersalnej metody określania aktywności biologicznej gleb.

Jak tłumaczy Autor różnicę aktywności dehydrogenazy w glebach inokulowanych i nie inokulowanych fitopatogenami?

Słusznie w rozprawie duży nacisk położono na metabolizm związków węglowych, który jest podstawową funkcją ekosystemów glebowych. Bardzo trafna jest uwaga, że w badaniach dotyczących mikrobioty zasiedlającej ryzosferę i endosferę roślin powszechnie należy uwzględniać mechanizm konkurencji w zasiedlaniu nisz ekologicznych, na który wskazuje profil wykorzystania składników znajdujących się w glebie.

Innowacyjnym i uniwersalnym narzędziem o wysokim potencjale zastosowania w analizie mikrobioty ryzosferowej **jest stosowany w rozprawie wskaźnik stresu substratowego**, którego wartość uległa istotnemu obniżeniu w fytosferze roślin inokulowanych szczepami bakteryjnymi. Wartość tego wskaźnika odpowiada ilorazowi wartości absorbancji mierzonych przy długościach 590 i 750 nm dla izolatów bakterii testowanych na płytkach GEN III oraz przy długościach 490 i 750 nm dla szczepów grzybów i Chromista testowanych na płytkach FF i jest średnią wartością uzyskaną w kolejnych dniach pomiaru. Jak wyjaśnione zostało w publikacji Pinzari in. 2017, do której odwołuje się Autor rozprawy, ten stosunek siły oddychania do wielkości biomasy, czyli tzw. iloraz metaboliczny, wykazuje wysoką niezawodność i daje szeroką możliwość wykorzystania jako mierzalna właściwość mikroorganizmów i wskaźnik wydajności lub sprawności organizmu. Z tego względu zaproponowany został jako wskaźnik stresu w ekosystemach glebowych. Wartość stosunku >1 wskazuje na stresową sytuację metaboliczną – zbyt duże wykorzystanie substratu przy małym przyroście biomasy, natomiast wartość <1 na dobre wykorzystanie substratu (równowagę pomiędzy oddychaniem a tworzeniem biomasy), czyli im niższa wartość wskaźnika stresu substratowego tym wyższa produkcja biomasy przy niskim wykorzystaniu substratu.

Na podstawie wartości wskaźnika stresu substratowego określono uzdolnienia i ograniczenia metaboliczne testowanych szczepów, odpowiednio mikroorganizmów korzystnie oddziałujących i patogennych dla roślin i dobrano skład prebiotycznej mieszanki suplementacyjnej



wspierającej wzrost korzystnych i zahamowanie wzrostu niekorzystnych dla roślin mikroorganizmów, czyli fitopatogenów. W składzie mieszanki suplementacyjnej o takim działaniu znalazły się trzy kwasy: α -ketoglutarynowy, jabłkowy i glutarynowy oraz N-acetylo-D-glukozamina.

Niewątpliwie badania będące podstawą ocenianej rozprawy wskazały na celowość stosowania a poprzez ich publikację przyczyniły się do upowszechnienia wiedzy o znaczeniu wskaźnika stresu substratowego dla zrozumienia funkcjonowania szczepów i zbiorowisk mikroorganizmów oraz wzajemnej interakcji członków mikrobioty.

Dlatego uważam, że wskaźnik stresu substratowego powinien być jeszcze bardziej wyeksponowany zarówno we wstępie i dyskusji publikacji (P2) jak i opisie tej publikacji w rozprawie z odwołaniem do danych literaturowych potwierdzających historię wykorzystania tego wskaźnika oraz z zamieszczeniem w rozdziale Materiały i metody sposobu jego obliczania w postaci konkretnego wzoru, w którym wyraźnie opisane byłyby składowe oraz zawarta byłaby interpretacja uzyskiwanych wartości wskaźnika.

Niezwykle ważne w ocenianej rozprawie jest także to, że oszacowano wpływ bakteryjnych składników biopreparatu nie tylko w stosunku do fitopatogenów, ale także wpływ tego kompleksu na stan mikrobioty ryzosfery i fyllosfery malin. Szczególnie cenne przy badaniu wpływu biopreparatu bakteryjnego na stan mikrobioty jest umiejętność wykorzystania świetnie opanowanych metod kompleksowej oceny zbiorowisk mikroorganizmów.

Wpływ zarówno naturalizacji, czyli inokulacji wybranymi szczepami bakteryjnymi jak też wprowadzenia fitopatogenów na mikrobiotę ryzosfery i fyllosfery malin zbadano stosując dwie odrębne wzajemnie uzupełniające się metody: (1) analizy funkcjonalnej ekofizjologicznej z wykorzystaniem płytek ECO systemu BiologTM, (2) analizy molekularnej sekwencjonowania następnej generacji (ang. *Next Generation Sequencing*, NGS).

Zastosowano jednocześnie aż 7 grup analiz oceniania mikrobiomów z rozróżnieniem bakterii i grzybów (1) różnorodności funkcjonalnej, (2) względnej obfitości typów mikroorganizmów, (3) liczby rzędów w obrębie bakterii i grzybów, (4) składu rdzeniowego mikrobiomu, (5) bioróżnorodności mikroorganizmów, (6) typów troficznych w obrębie mikrobiomu, (7) typów funkcjonalnych mikroorganizmów.

Zamieszczono bardzo dokładny opis metod koniecznych do przeprowadzenia kolejnych etapów tej analizy obejmującej izolację DNA i sekwencjonowanie następnej generacji, co wskazuje na bardzo dobre opanowanie tych metod przez Doktoranta i zachowanie właściwych procedur z uwzględnieniem indeksowania produktów PCR podwójnymi indeksami oraz sekwencjami adaptorowymi IlluminaTM, oczyszczania, normalizacji, denaturacji biblioteki i sekwencjonowania w aparacie MiSeq (Illumina). Wyniki sekwencjonowania zostały przeanalizowane z wykorzystaniem środowiska QIIME2 i PICRUST oraz narzędzia FUNGuild z wykorzystaniem baz danych SILVA i UNITE odpowiednio dobranych dla bakterii i grzybów.

Określając wpływ strategii naturalizacji i patosystemów na bioróżnorodność zbiorowisk bakterii i oddzielnie zbiorowisk grzybów obliczono 3 bardzo ważne wskaźniki: (1) równości Pielou, wskazujący na różnicę liczby wariantów sekwencji amplikonu ASV - ang. *Amplicon Sequence Variant* i operacyjnych jednostek taksonomicznych OTU ang. *Operational Taxonomic*



Unit, (2) zróżnicowania Shannon'a porównujący liczby ASV/OTU zasiedlających daną niszę ekologiczną i ich względną obfitość (3) zróżnicowania filogenetycznego Faith'a uwzględniający pokrewieństwo filogenetyczne poszczególnych mikroorganizmów bez uwzględniania ich obfitości.

Ta niezwykle bogata w dane analiza została kompleksowo przeprowadzona i wniosła ogromną ilość informacji a ponadto została doskonale zobrazowana graficznie i opisana. Wskazano, że wprowadzenie inokulum fitopatogenów bardzo silnie wpłynęło na wzrost bioróżnorodności natomiast wprowadzenie inokulum wybranych bakterii metodą naturalizacji łączonej w nieobecności patogenów spowodowało najwyższy wzrost wartości wskaźników bioróżnorodności dla zbiorowisk bakterii. Wartości różnorodności dla zbiorowisk grzybowych, w przeciwieństwie do tych wartości dla zbiorowisk bakteryjnych, ulegały obniżeniu w obecności patogenów oraz po zastosowaniu strategii naturalizacji. W fylosferze malin wskaźniki bioróżnorodności zbiorowisk mikroorganizmów przedstawiały się odmiennie niż w ryzosferze, podlegały zmianom wywoływanym obecnością patogenów i silnie różniły się w zależności od zastosowanej strategii naturalizacji.

Za pomocą narzędzia FUNGuild zidentyfikowano obecne w próbkach ryzosfery typy troficzne mikroorganizmów grzybowych: patotrofy, saprotrofy, symbiotrofy i ich kombinacje. Zastosowanie naturalizacji łączonej lub podlewania naturalizacyjnego zmniejszyło bogactwo OTU organizmów patotroficznych oraz saprotroficznych w ryzosferze a zwiększyło multitroficznych. Natomiast obecność fitopatogenów grzybowych spowodowała także zmniejszenie bogactwa OTU organizmów patotroficznych ale zwiększyła bogactwo OTU organizmów sapro-symbiotroficznych i pato-saprotroficznych. W fylosferze każda z metod naturalizacji powodowała obniżenie liczby OTU pato-symbiotrofów i jednocześnie wzrost multitrofów.

Środowisko PICRUSt i baza KEGG pozwoliły na przeanalizowanie sekwencji amplikonów bakteryjnych i podział tych sekwencji na grupy odpowiedzialne za poszczególne procesy metaboliczne. W obecności fitopatogenicznych grzybów i *Chromista*, z wyjątkiem *B. cinerea*, obserwowane było zwiększenie obfitości funkcjonalnych ASV. Wykazano, że naturalizacja łączona powodowała najsilniejszy, ale nieistotny statystycznie, wzrost liczby genów odpowiedzialnych za metabolizm bakterii i procesy komórkowe.

Rozprawa zawiera też ważne spostrzeżenie, że wprowadzenie inokulum wybranych bakterii może skutkować zmniejszeniem indeksu bioróżnorodności Shannona dla zbiorowisk grzybów.

Jak Doktorant na podstawie wpływu zastosowanych metod naturalizacji wytłumaczyłby użyte w rozprawie wyrażenie „wspieranie zbiorowisk mikroorganizmów”? Czym jest to wspieranie i czy zostało osiągnięte?

Podczas analizy rozprawy doktorskiej nasunęły mi się pytania, które zadałam powyżej pod każdym z analizowanych zagadnień. Podkreślam, że mają one charakter dyskusyjny wynikający z bardzo dużej złożoności i wielokierunkowości przeprowadzonych badań i potwierdzają tylko moją bardzo wysoką ocenę rozprawy.



Drobne uwagi edycyjne i językowe

Rozprawa doktorska mgr. inż. Michała Pylaka wyróżnia się wielką starannością przygotowania i przejrzystością opisu poszczególnych publikacji składających się na cykl będący podstawą rozprawy. Rozprawa zawiera nieliczne błędy literowe i kilka tylko zwrotów, które stanowią albo skróty myślowe albo są anglicyzmami lub kalkami językowymi, które powinny być zastąpione polskimi odpowiednikami, np.: wyrażenie „liczne eksudaty korzeniowe” (str. 16) powinno być zastąpione wyrażeniem „liczne składniki wydzielin korzeniowych”; a zwrot ”w warunkach kontaminacji przez wybrane fitopatogeny” (str. 23) powinien być zamieniony na „w warunkach skażenia, porażenia lub po prostu obecności fitopatogenów”, ale raczej nie zanieczyszczenia fitopatogenami; słowo „utyliczacja” substratów – lepiej zastąpić polskim odpowiednikiem „wykorzystywanie” lub „używanie”.

Do najczęściej powtarzających się słów stosowanych w rozprawie należy „prezerwacja” lub metoda „prezerwacji”, które powinno być zastąpione odpowiednim polskim wyrażeniem. Czy Doktorant może zaproponować polski odpowiednik i rozwinąć, jaki zakres metod dotyczący zabezpieczenia właściwości i przeżywalności szczepów podczas ich przechowywania zapewniającego stabilność cech kryje się pod tym słowem?

Do najczęściej pojawiających się w rozprawie wyrażen należy natomiast połączenie „pożyteczne mikroorganizmy”. O ile jest ono poprawne to nie oddaje istoty tego wyrażenia w stosunku do mikroorganizmów korzystnie oddziałujących na rośliny, glebę i mikrobiotę tych środowisk i lepiej byłoby, gdyby w wielu miejscach rozprawy stosowane było w innej formie.

Analiza tej niezwykle interesującej rozprawy doktorskiej skłania mnie do zadania kilku pytań Doktorantowi, którego na podstawie oceny jego rozprawy postrzegam jako eksperta w dziedzinie ochrony owoców przed chorobami:

1. Jak ocenia Doktorant perspektywy rozwoju biopreparatów działających w oparciu o mechanizm indukowania odporności, szczególnie szeroko rozpowszechniony w Europie i w Polsce w uprawie truskawek? Proszę Doktoranta o opinię o preparacie Polyversum (firma Bio Agris) opartym na mykopasożytniczym szczepie *Pythium oligandrum* oddziałującym nie tylko bezpośrednio ale także poprzez roślinę indukując jej odporność za pomocą białkowego elicytora oligandryny. Czy może być skuteczny w ochronie malin przed *Botritis cinerea* i innymi grzybami fitopatogenicznymi? Czy Doktorant może porównać tę skuteczność do preparatów skomponowanych w ramach projektu i opisanych w publikacjach będących podstawą rozprawy doktorskiej?
2. Jakie są wady i zalety indukowanej odporności roślin czynnikami biotycznymi oraz stosowania syntetycznych elicytorów, głównie analogów kwasu salicylowego, takich jak BTH (benzotiadiazol) ale także chitozan czy glukany?
3. Ponadto proszę Doktoranta o opinię w sprawie preparatów miedziowych, które stosowane były powszechnie w ochronie owoców, szczególnie winorośli, ich skuteczności oraz planach ich wycofania z użycia.



4. Proszę też o odniesienie się do aspektu porównywalności efektu stymulującego wzrost i ochronnego działania biopreparatów na części nadziemne i podziemne roślin oraz biomasę tych organów z efektem oddziaływania na plon owoców: ich liczbę, wielkość i biomasę. Czy biopreparaty chroniące przed atakiem fitopatogenów korzenie i łodygi chronią kwiaty i owoce, szczególnie miękkie, przed infekcją fitopatogenami? Czy intensywność ochrony owoców jest zbliżona do intensywności ochrony korzeni, łodyg i liści?
5. Czy skuteczność ochrony owoców nie byłaby największa przy wprowadzaniu preparatu w okresie kwitnienia? Czy inokulacja kwiatów byłaby możliwa ze względu na okresy karencji i jaki biopreparat ze względów bezpieczeństwa żywności mógłby być rozważany do zastosowania bezpośrednio na owoce miękkie po zbiorze chroniąc je podczas przechowywania? Czy biopreparaty sprawdzające się w ochronie roślin podczas wegetacji mogą zapewnić ochronę owoców w okresie przechowywania?

Podsumowanie

Rozprawa doktorska mgr. inż. Michała Pylaka wytycza nowe drogi postępowania i dostarcza doskonale opracowaną kompleksową procedurę, jaką należy stosować przy tworzeniu skutecznych biopreparatów nawożeniowych, stymulujących wzrost oraz chroniących rośliny przed fitopatogenami. Jest godnym naśladowania wzorem holistycznego podchodzenia do nowoczesnego zrównoważonego rolnictwa oraz łączenia tradycyjnych i nowoczesnych metod w celu zapewnienia najwyższej jakości i skuteczności tworzonych preparatów i jednoczesnego bezpieczeństwa ich stosowania dla stanu mikrobioty ryzosfery i endosfery roślin.

Oceniana rozprawa doktorska bardzo znacząco przyczynia się do poszerzenia wiedzy zarówno o ogólnym podejściu do koncepcji zrównoważonego rolnictwa, ze szczególnym uwzględnieniem rolnictwa ekologicznego, ustaleń legislacyjnych na poziomie Europejskim i ogólnosiwiatowym jak też do zastosowania odpowiednio dobranych technik badawczych umożliwiających selekcję mikrobiologicznych składników biopreparatów oraz bardzo dokładnej kontroli wpływu biopreparatów na środowisko poprzez badania składu i funkcji mikrobioty z zastosowaniem badań ekofizjologicznych i molekularnych.

Rozprawa doktorska została bardzo dobrze napisana, cechuje ją innowacyjność poruszanych problemów oraz wykorzystanych narzędzi badawczych, zgodność z założeniami i dokładna realizacja postawionych celów a także znaczny wkład w rozwój problematyki ochrony roślin i bioróżnorodności środowiska.

Rozprawa doktorska mgr. inż. Michała Pylaka wnosi istotny wkład w rozwój nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo

Wysoka jakość rozprawy doktorskiej i publikacji stanowiących jej podstawę jak również informacje przedstawione w życiorysie naukowym (str. 207-208) wskazują, że mgr inż. Michał Pylak jest ambitnym młodym naukowcem z doskonale opanowanym warsztatem badawczym i rozumiejącym złożoność zadań badawczych prowadzących do rozwiązywania naukowych problemów w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.



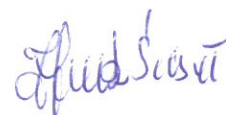
Wniosek końcowy

Z całym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska pana mgr. inż. Michała Pylaka **spełnia wymagania ustawy o stopniach i tytule naukowym** (art. 190 ust. 3 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 18 lipca 2018 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 574 ze zm. w związku z art. 179 ust. 6 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce) **i stanowi podstawę do nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.**

Wnoszę do rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr. inż. Michała Pylaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnoszę o **wyróżnienie rozprawy doktorskiej** mgr. inż. Michała Pylaka stosowną nagrodą ze względu na bardzo wysoki poziom merytoryczny rozprawy, jej nowatorstwo i kompleksowe zastosowanie zaawansowanych, odpowiednio dobranych i bardzo dobrze opanowanych technik badawczych oraz aplikacyjność uzyskanych wyników.

Lublin, 12.11.2022 r.



dr hab. Jolanta Jaroszuk-Ścisiel, prof. UMCS

