

Katowice, dn. 14 listopada 2022 r.

dr hab. Tomasz Płociniczak  
profesor Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach  
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
e-mail: tomasz.plociniczak@us.edu.pl  
tel. +48667125783

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR. MATEUSZA MĄCIKA  
PT. WPŁYW FOSFOROWEGO NAWOZU MINERALNEGO WZBOGACONEGO  
MIKROBIOLOGICZNIE NA AKTYWNOŚĆ I RÓŻNORODNOŚĆ MIKROORGANIZMÓW  
GLEBOWYCH

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska składa się z trzech opublikowanych artykułów naukowych (P.1 – P.3), jednego manuskryptu gotowego do wysłania do czasopisma naukowego (P.4) oraz opracowania w języku polskim będącego syntetycznym omówieniem cyklu wymienionych wyżej prac.

Tytuły artykułów naukowych wchodzących w skład pracy doktorskiej wraz z wybranymi wskaźnikami naukowymi przedstawiają się następująco:

P.1 Mącik, M., Gryta, A., Frąc M., 2020. Biofertilizers in agriculture: An overview of concepts, strategies and effects on soil microorganisms. *Advances in Agronomy* 162, 31-87. (IF = 6,919; Q1 Agronomia, Nauki o glebie)

P.2 Mącik, M., Gryta, A., Sas-Paszt, L., Frąc, M., 2020. The Status of Soil Microbiome as Affected by the Application of Phosphorus Biofertilizer: Fertilizer Enriched with Beneficial Bacterial Strains. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 8003. (IF = 5,924; Q2 Biologia molekularna)

---

Uniwersytet Śląski w Katowicach  
Wydział Nauk Przyrodniczych  
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska  
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice  
tel.: 32 20 09 592, 32 20 09 461, e-mail: ibbios.wnp@us.edu.pl

stał Płociniczak



P.3 Mącik, M., Gryta, A., Sas-Paszt, L., Frąc, M., 2022. Composition, activity and diversity of bacterial and fungal communities responses to inputs of phosphorus fertilizer enriched with beneficial microbes in degraded Brunic Arenosol. *Land Degradation & Development* 33(6), 844-865. (IF<sub>2021</sub> = 4,377; Q1 Nauki o środowisku, Nauki o glebie)

P.4 Mącik, M., Gryta, A., Sas-Paszt, L., Frąc M. New insight into the soil bacterial and fungal microbiome after phosphorus biofertilizer application as important driver of regenerative agriculture including biodiversity loss reversing and soil health restoration.

Oświadczenia współautorów prac wykazują jednoznacznie dominującą rolę zespołu Pani prof. dr hab. Magdaleny Frąc w opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu eksperymentów, analiz, opracowaniu wyników, a także przygotowaniu manuskryptów. Ponieważ w pracach tych uczestniczyły jedynie trzy osoby z zespołu Pani Profesor, już na tej podstawie wkład mgr. Mateusza Mącika w ich powstanie należy uznać za istotny. Dokładna lektura oświadczeń współautorów prac pozwala wnioskować, iż był to wkład wiodący, szczególnie biorąc pod uwagę wykonywanie przez Doktoranta analiz genetycznych, biochemicznych, a także opracowanie statystyczne wyników. Wkład partnera zewnętrznego – prof. dr hab. Lidii Sas-Paszt, choć niezbędny do realizacji zadań badawczych, dotyczył współudziału w opracowaniu koncepcji badań, pozyskaniu finansowania zewnętrznego, a także edycji i korekty gotowych manuskryptów. We wszystkich artykułach mgr Mateusz Mącik wskazany został jako pierwszy autor publikacji. Świadczy to o sprawnym i efektywnym funkcjonowaniu zespołu badawczego, w którym role poszczególnych członków określono prawidłowo, a zakres zaangażowania w poszczególne zadania nie budzi wątpliwości.

Wszystkie artykuły zawarte w pracy doktorskiej stanowią spójny zestaw opracowań opisujący możliwość zastosowania wzbogaconego mikrobiologicznie nawozu fosforowego (zwanego w pracy bionawozem) do zwiększenia biodostępności tego pierwiastka w glebie, czego spodziewanym efektem jest zwiększenie plonowania kukurydzy. Oprócz wpływu bionawożenia na wielkość plonu kluczowym elementem prac P.2, P.3 i P.4 było również określenie ekologicznych konsekwencji tych zabiegów na strukturę zespołów mikroorganizmów glebowych.



mgr Mącik





Cykl artykułów rozpoczyna praca przeglądowa P.1 opublikowana jako rozdział w książce *Advances in Agronomy*, która w sposób wyczerpujący omawia zagadnienia związane z potencjałem zastosowania bionawozów we współczesnym rolnictwie. W pracy podkreślono korzyści stosowania wzbogaconych mikrobiologicznie nawozów, a także samych mikroorganizmów promujących wzrost roślin jako alternatywy i/lub uzupełnienia dla tradycyjnie stosowanych praktyk rolniczych. Dodatkowo w pracy scharakteryzowano najpopularniejsze nośniki bionawozów, omówiono proces produkcji takich preparatów, a także dokonano charakterystyki bionawozów na podstawie mechanizmów ich działania. Ponieważ wielu autorów prac badawczych z tematu wspomaganie wzrostu roślin pomija zagadnienia związane z wpływem inokulowanych szczepów na mikroorganizmy autochtoniczne wartościowym fragmentem pracy P.1 jest również rozdział, który podkreśla konieczność prowadzenia takich badań, a także charakteryzuje techniki molekularne, które mogą być do tego celu wykorzystane. Część z tych technik Doktorant wykorzystał do śledzenia zmian w strukturze zespołów mikroorganizmów glebowych po aplikacji nawozów i bionawozów.

W publikacjach P.2, P.3 oraz w badaniach uzupełniających obejmujących manuskrypt publikacji P.4, badano zagadnienie wykorzystania bionawozów we współczesnym rolnictwie oraz scharakteryzowano wpływ innowacyjnego fosforowego nawozu mineralnego wzbogaconego mikrobiologicznie na aktywność i bioróżnorodność mikroorganizmów zasiedlających zdegradowane gleby uprawne. W dwuletnim doświadczeniu polowym prowadzonym w latach 2018 - 2019 na dwóch typach gleb zdegradowanych (bielicowej wytworzonej z piasku słabogliniastego, *Brunic Arenosol-BA* i bielicowej wytworzonej z pyłu, *Abruptic Luvisol -AL*) uwzględniono trzy warianty nawożenia fosforowego: dawkę optymalną bez wzbogacenia mikrobiologicznego (FC), dawkę optymalną wzbogaconą mikrobiologicznie (FA100) oraz dawkę nawozu komercyjnego zredukowaną o 40% wzbogaconą mikrobiologicznie (FA60). Dawki stosowanych nawozów chemicznych obliczono indywidualnie dla każdej z gleb.

Celem rozprawy doktorskiej było określenie wpływu fosforowego nawozu mineralnego wzbogaconego mikrobiologicznie na aktywność enzymatyczną i różnorodność funkcjonalną i genetyczną zespołów mikroorganizmów zasiedlających gleby zdegradowane. Do osiągnięcia założonych celów badawczych zastosowano następujące metody badawcze:



str 3 Phaed



- określenie aktywności wybranych enzymów glebowych: proteazy, ureazy, fosfatazy kwaśnej oraz  $\beta$ -glukozydazy,
- określenie różnorodności funkcjonalnej mikroorganizmów glebowych na podstawie analizy profilu metabolicznego zbiorowisk mikroorganizmów przy zastosowaniu płytek metabolicznych BIOLOG™ (ECO oraz FF),
- określenie różnorodności genetycznej zbiorowisk bakterii, archeonów oraz grzybów na podstawie analizy polimorfizmu długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych (t-RFLP) oraz
- analiza metataksonomiczna, z zastosowaniem sekwencjonowania następnej generacji (*Next Generation Sequencing* – NGS), zbiorowisk bakterii i grzybów występujących w glebie poddanej działaniu fosforowego nawozu mineralnego wzbogaconego mikrobiologicznie.

Są to metody adekwatne, nowoczesne i umożliwiają osiągnięcie założonych celów badawczych.

Źródłem fosforu był nawóz mineralny SUPER FOS DAR 40 (Grupa Azoty, Puławy), a jego modyfikacja mikrobiologiczna polegała na opłaszczeniu na granulach nawozu trzech szczepów bakterii *Paenibacillus polymyxa* (CHT114AB), *Bacillus amyloliquefaciens* (AF75BB) oraz *Bacillus* sp. (CZP4/4), które zostały wyselekcjonowane z kolekcji SYMBIOBANK Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach. Bakterie opisano jako „pożyteczne” co jest jednak określeniem bardzo ogólnym. Nie zamieszczono informacji, jaką metodą dokonano identyfikacji szczepów, jakie mechanizmy sprzyjające rozwojowi roślin prezentowały wykorzystane szczepy, czy były one klasyfikowane jako bakterie wspomagające wzrost roślin, skąd zostały wyizolowane i co ważne, czy nie wykazywały względem siebie oddziaływań antagonistycznych w obrębie wprowadzonej społeczności. Przykładowo, bakterie z rodzaju *Bacillus* są efektywnymi producentami substancji o charakterze antybiotycznym, co może istotnie wpływać na oddziaływania bakterii w obrębie samego inokulum, a także na interakcje pomiędzy wprowadzonymi z bionawozem szczepami a mikroorganizmami autochtonicznymi w glebie. Z punktu widzenia mikrobiologa ważne jest również, czy w równym stopniu były one zdolne do pokrywania powierzchni nośnika, jaka była liczba jednostek tworzących kolonię (j.t.k.) poszczególnych szczepów na nośniku, czy były to komórki żywe czy formy przetrwalne (spory) i wreszcie, czy bezpośredni kontakt szczepów z granulami nośnika nie wpływał negatywnie na przeżywalność szczepów w czasie przechowywania bionawozu lub po jego aplikacji do gleby.

slu 4 plawez







**Podsumowując powyższe chciałem zapytać czy Doktorant dysponuje charakterystyką szczepów wykorzystanych w doświadczeniach w zakresie, o którym mowa powyżej?**

Przedstawione komentarze mają szczególne zastosowanie w przypadku prowadzenia badań podstawowych. Ponieważ badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej zostały zrealizowane w ramach projektu "Opracowanie technologii innowacyjnych nawozów mineralnych wzbogaconych mikrobiologicznie" (BIO-FERTIL) (BIOSTRATEG3/347464/5/NCBR/2017) zrealizowanego w ramach strategicznego programu badań naukowych i prac rozwojowych "Środowisko naturalne, rolnictwo i leśnictwo" - BIOSTRATEG, współfinansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR), wnioskuję, że głównym celem projektu było opracowanie skutecznej technologii wzbogacania gleby w fosfor, a także wywołanie korzystnych zmian w mikrobiomie gleby czyli badania ukierunkowane na efektywną aplikację bionawozów, zwiększenie plonowania roślin i przywrócenie pełnej funkcjonalności gleb zdegradowanych.

W publikacji P.2 przedstawiono wyniki badań dotyczących odpowiedzi zespołów mikroorganizmów gleb BA i AL na aplikację testowanego nawozu (FC) i bionawozów (FA100 i FA60). Próby pobierano w roku 2018, po siedmiu dniach od wprowadzenia nawozów. Analiza uzyskanych wyników potwierdziła pozytywny wpływ wprowadzanego bionawozu fosforowego na badane parametry mikrobiologiczne gleb, tj. aktywność enzymatyczną oraz różnorodność funkcjonalną i genetyczną bakterii, archeonów i grzybów.

Zwiększoną aktywność enzymatyczną, np. proteaz powiązano m.in. z aktywnością mikroorganizmów wchodzących w skład inokulum, a także ich współpracą z mikroorganizmami rodzimymi, tymczasem analiza metataksonomiczna (Tabela S2) ujawniła większą liczbę sekwencji bakterii z rodzaju *Bacillus* w glebie kontrolnej (FC) względem układów FA60 i FA100 w glebie BA i porównywalną we wszystkich układach w glebie AL. Czy jest to zatem twierdzenie uprawnione w pełni potwierdzone wynikami analiz?

Podobnie w kolejnej części dyskusji podkreślono, że wprowadzenie do gleby szczepów w postaci inokulum może stymulować mikroorganizmy autochtoniczne do degradacji węglowodanów. Tymczasem brak weryfikacji przeżywalności wprowadzanych szczepów w glebie niesie ryzyko wystąpienia sytuacji, że to właśnie wprowadzane szczepy, jako martwa biomasa, stają się dodatkowym źródłem węgla i energii dla mikroorganizmów rodzimych.



sh 5 Mawez



Należy mieć również na uwadze, że analizy struktury zespołów mikroorganizmów glebowych wykonywane na podstawie sekwencjonowania fragmentu genu 16S rRNA (po izolacji DNA), a następnie przewidywanie aktywności mikroorganizmów na podstawie obecności tych sekwencji w glebie jest podejściem obciążonym pewnym błędem, ponieważ DNA może występować w glebie przez dłuższy czas po śmierci i lizie mikroorganizmów, przez co w sposób znaczący może zaburzać wyniki tego typu analizy. Dodatkowo, nawet obecność specyficznych genów kodujących dane mechanizmy nie gwarantuje ich ekspresji i rzeczywistej aktywności przytaczanych mechanizmów. Podejście prezentowane przez Doktoranta jest obecnie często spotykane w literaturze naukowej, a uwagi recenzenta mają na celu zwiększenie krytycznego podejścia w interpretacji wyników i ich późniejszej dyskusji.

W publikacji P.3 przedstawiono sezonowe zmiany w statusie mikro- i myko-biomu w glebie BA po aplikacji testowanych bionawozów. W układach do których aplikowano bionawóz stwierdzono wyższą aktywność testowanych enzymów, a także większy plon w porównaniu z układem, w którym stosowano jedynie nawóz konwencjonalny.

Analizując wyniki plonowania kukurydzy zamieszczone w publikacji P.3 nasuwa się pytanie co było przyczyną tak drastycznego zmniejszenia plonów w roku 2019 względem roku 2018 i czy ten czynnik nie miał wpływu na wyniki uzyskane z prób datowanych na rok 2019? Ta bardzo ciekawa kwestia powinna być moim zdaniem wyjaśniona. Bardzo ciekawym i cennym wynikiem jest wykazanie najwyższej skuteczności bionawozu FA60, który pokazuje, że z wykorzystaniem komponentu mikrobiologicznego w nawozie możliwa jest redukcja stosowania nawożenia fosforowego aż o 40%. To wymierny efekt w postaci ochrony środowiska, zasobów naturalnych, ale także zysk ekonomiczny.

Na rysunku nr 4 przedstawiono procentowy udział sekwencji bakterii należących do poszczególnych rzędów. We wszystkich próbkach znajdują się również sekwencje charakterystyczne dla rzędu *Bacillales*, jednak nie są one omawiane i dyskutowane. Czy różnice pomiędzy próbkami były istotne statystycznie? Czy wprowadzanie bionawozu zwiększało istotnie liczebność sekwencji charakterystycznych dla tego rodzaju?

Czy termin poboru prób był wybrany na podstawie danych pogodowych, tak aby warunki pogodowe pomiędzy poszczególnymi latami były jak najbardziej zbliżone? W publikacji zaznaczono,



dr G. Alcega





że opady w okolicach czasu poboru prób były podobne. Mikroorganizmy glebowe reagują bardzo szybko na zmiany warunków atmosferycznych, głównie zawartości wody w glebie, niestety nie podano wartości zawartości wody w glebie w próbach gleby, które wykorzystano do analiz. Czy Doktorant dysponuje takimi danymi?

Podobnie, sezonowe zmiany w strukturze i aktywności mikroorganizmów glebowych opisano w manuskrypcie P.4. W porównaniu z pracą P.3, w ostatnim manuskrypcie analizowano glebę AL.

W manuskrypcie publikacji P.4 opisano szczepy CHT114AB, AF75BB i CZP4/4 jako posiadające korzystne cechy, tj. zdolność do produkcji fitohormonów, zwiększanie biodostępności pierwiastków, zdolność do syntezy antybiotyków, formowanie biofilmu oraz łagodzenie stresów powołując się przy tym na 3 prace, w których jednak szczepy te nie były testowane. Założenie, że opisane powyżej szczepy będą prezentowały korzystne cechy tylko dlatego, że przynależą do gatunków, których wybrane inne szczepy posiadają takie cechy jest tylko domysłem. Właściwości te powinny być zweryfikowane testami biochemicznymi, analizami transkryptomycznymi lub przynajmniej poprzez analizę genomu tych szczepów, która wskazałaby ich potencjał do promowania wzrostu roślin np. poprzez zwiększanie biodostępności związków fosforowych.

Analizując Rys. 5 ponownie największy procentowy udział sekwencji charakterystycznych dla Firmicutes stwierdzono w próbach kontrolnych. Natomiast analiza zespołów bakterii *Bacillus/Paenibacillus* na poziomie rzędu nie uwzględnia ich wcale. Skąd zatem pewność, że stosowane w inokulum szczepy były odpowiedzialne za obserwowane efekty? Czy analizę polimorfizmu długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych typu multiplex (M-tRFLP) można wykorzystać do wykrycia (szybki test) obecności terminalnych fragmentów restrykcyjnych (T-RFs) charakterystycznych dla szczepów wchodzących w skład inokulum? W jakim celu stosowano tę analizę, skoro w badaniach wykorzystano również sekwencjonowanie następnej generacji (NGS)?

**Powyższe uwagi i pytania świadczą o zainteresowaniu, jakie wywołały u mnie prowadzone przez Doktoranta badania i uzyskane wyniki. Na podkreślenie zasługuje ilość i różnorodność przeprowadzonych analiz, a także ich zakres, tj. analiza zarówno bakterii, archeonów, jak i grzybów. Wielowymiarowość i wieloaspektowość tych analiz zasługuje na szczególne uznanie.**



5/10 7/10/2023



Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowano 10 wniosków, które sugerują większą skuteczność stosowanych bionawozów w porównaniu z nawozem chemicznym. Zaobserwowano pozytywne efekty stosowania tych preparatów objawiające się zwiększeniem aktywności enzymatycznej gleby, zwiększeniem ilości biodostępnego fosforu w glebie, a także zmianami w strukturze genetycznej i funkcjonalnej mikroorganizmów, które mogą świadczyć o polepszeniu parametrów gleby, skutkujących możliwością uzyskania większych plonów. Doktorant założył, że mikroorganizmy zasiedlające inokulum są żywe, nie wykazują aktywności antagonistycznych względem siebie i są aktywne po wprowadzeniu do gleby, co moim zdaniem wymaga jednak weryfikacji. Być może tak jest, jednak w kontekście planowania kolejnych projektów i badań naukowych rekomenduję sprawdzenie także tych parametrów. **Na podkreślenie zasługuje przeprowadzenie eksperymentów w warunkach polowych, co czyni uzyskane wyniki wartościowymi, szczególnie z aplikacyjnego punktu widzenia. Tego typu warunki, odmienne od „bezpiecznych” warunków doniczkowych lub szklarniowych, generują dodatkowe trudności metodyczne i interpretacyjne. Niemniej uważam, że warto się z nimi zmierzyć w celu uzyskania wyników badań prowadzonych w warunkach cechujących się zmiennością i często również nieprzewidywalnością, a które to wyniki potwierdzają przydatność stosowanych rozwiązań w praktyce rolniczej.** Ciekawych wyników mogłaby dostarczyć jeszcze jedna kontrola (szczególnie w przypadku gleby BA), która polegałaby na aplikacji jedynie mikroorganizmów, które w zależności od posiadanych mechanizmów mogłyby się przyczynić do zwiększenia puli biodostępnego fosforu w glebie.

Recenzując pracę doktorską mgr. Mateusza Mącika wykonaną w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN w Lublinie z dziedziny nauk rolniczych mam na uwadze, że kluczowym elementem pracy oprócz aspektu poznawczego ma także walor praktyczny. Do najistotniejszych efektów tej pracy należy niewątpliwie określenie wpływu stosowanych zabiegów na zwiększenie efektywności plonowania, a także poznanie wpływu tych zabiegów na strukturę mikroorganizmów glebowych, co jest istotne z punktu widzenia nowoczesnego, przyjaznego środowisku rolnictwa. Z obowiązku recenzenta, którego zainteresowaniem naukowym jest mikrobiologia środowiskowa, zgłosiłem kilka uwag, sugestii, a także zapytań, które w dużej mierze dotyczą aspektu mikrobiologicznego na etapie charakterystyki stosowanych szczepów, a także istotnych w czasie przygotowania i magazynowania biopreparatu. Ponieważ trzy z prezentowanych

*cbp & Mateusz*





czterech prac (w tym dwie oryginalne prace doświadczalne) są już opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych, a więc przeszły skrupulatny proces weryfikacji, a także modyfikacji pod wpływem komentarzy recenzentów, **moje pytania i komentarze traktuję jako impuls do dyskusji w czasie obrony pracy doktorskiej mgr. Mateusza Męcika oczekując ustosunkowania się Doktoranta do powyższych kwestii.**

Przechodząc do wniosku końcowego należy podkreślić, że cel prowadzonych badań został osiągnięty, a hipoteza badawcza została zweryfikowana doświadczalnie. Dobór metodyki badawczej, sposób analizy i przedstawienia wyników, a także ich dyskusji niewątpliwie świadczy o dojrzałości naukowej Doktoranta. Nie budzi również wątpliwości wiodący wkład Doktoranta w powstanie publikacji naukowych na bazie prowadzonych badań. Na podkreślenie zasługują również wysokie wartości współczynnika *Impact Factor* czasopism, w których opublikowano do tej pory artykuł przeglądowy i uzyskane wyniki.

#### WNIOSEK KOŃCOWY

Reasumując, po zapoznaniu się z otrzymanymi materiałami jestem przekonany, że przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr. Mateusza Męcika spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). Zgłaszam zatem formalny wniosek do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN w Lublinie o dopuszczenie mgr. Mateusza Męcika do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych i dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

*Wojciech Płociniec*

