



Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań  
Tel. centrala: 61 6550200, sekretariat: 61 6550255 E-mail: office@igr.poznan.pl  
www.igr.poznan.pl  
NIP: 7811621455 REGON: 000326204 BDO: 000017736

dr hab. Lidia Błaszczyk, prof. IGR PAN  
Zakład Mikrobiomiki Roślin  
Instytut Genetyki Roślin  
Polskiej Akademii Nauk  
ul. Strzeszyńska 34  
60-479 Poznań

Poznań, dnia 18 listopada 2022 roku

### RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana **mgr. inż. Michała Pylaka**  
pt: "**Opracowanie bakteryjnego kompleksu do naturalizacji ryzosfery malin**",  
wykonanej pod kierunkiem Pani **prof. dr hab. Magdaleny Frąc**  
i **dr Karoliny Oszust** w **Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego**  
**Polskiej Akademii Nauk w Lublinie.**

Podstawą formalną niniejszej recenzji jest pismo Dyrektora Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN z dnia 12 września 2022 roku, w którym to zostałam poinformowana o powierzeniu mi Uchwałą Nr 209/P22/2022 Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN funkcji recenzenta w postępowaniu w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo wszczętego na wniosek mgr. inż. Michała Pylaka.

#### **Recenzja została przygotowana na podstawie dokumentacji obejmującej:**

- rozprawę doktorską mgr. inż. Michała Pylaka w wersji papierowej i elektronicznej – załącznik nr 1;
- kopię uchwały Nr 209/P22/2022 Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN z dnia 12 września 2022 w sprawie wyznaczenia recenzentów rozprawy doktorskiej mgr. inż. Michała Pylaka – załącznik nr 2;
- sposób postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN w Lublinie uchwalony dnia 9 grudnia 2021 r. ze zm – załącznik nr 3.

#### **OCENA FORMALNA**

Głównym elementem przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej Pana mgr. inż. Michała Pylaka jest spójny tematycznie cykl trzech publikacji (P.1 – P.3) zatytułowany: "Opracowanie bakteryjnego kompleksu do naturalizacji ryzosfery malin", uzupełniony o manuskrypt pracy (P.4, Structural and functional shift of soil rhizosphere and raspberry shoots microbiomes underlying changes caused by phytopathogens contamination and naturalization strategies implementation) obejmującej analizę zmian strukturalnych i funkcjonalnych w zbiorowiskach mikroorganizmów zasiedlających ryzosferę i fyllosferę malin w wyniku obecności fitopatogenów, a także aplikacji inokulum pożytecznych bakterii. Publikacja P.1 wchodząca w skład rozprawy doktorskiej to praca przeglądowa, a dwie pozostałe publikacje (P.2 i P.3) to oryginalne prace badawcze, opublikowane odpowiednio w roku 2019, 2020 i 2021 w

anglojęzycznych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR):

P.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 (Impact Factor: 5,261; punktacja wg MEIN: 140).

P.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 (Impact Factor: 5,924; punktacja wg MEIN: 140).

P.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 (Impact Factor: 3,949; punktacja wg MEIN: 100).

Sumaryczny Impact Factor (podany według roku publikacji), wszystkich publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi 15,134, a łączna wartość punktowa, wg MEIN (podana według roku publikacji) jest równa 380. We wszystkich publikacjach Pan mgr inż. Michał Pylak jest pierwszym autorem i był odpowiedzialny za przygotowanie manuskryptów tych prac. Ponadto wkład Doktoranta w powstanie pracy P.1 obejmował przegląd literatury dotyczący biopreparatów stosowanych w rolnictwie i mechanizmów ich działania. W publikacji P.2 Doktorant brał istotny udział w przeprowadzeniu izolacji środowiskowych szczepów bakterii oraz ich identyfikacji, zbadaniu ich właściwości antagonistycznych oraz katalitycznych, a w pracy P.3, Pan mgr inż. Michał Pylak brał istotny udział w przeprowadzeniu optymalizacji warunków hodowli i prezerwacji szczepów bakterii, zaprojektowaniu i przeprowadzeniu doświadczenia wazonowego. W obydwu oryginalnych pracach badawczych Doktorant dokonał analizy uzyskanych wyników, a także ich statystycznego i graficznego opracowanie. Z danych zamieszczonych w oświadczeniach Doktoranta i współautorów wynika, że wkład jaki wniósł Doktorant w powstanie tych trzech prac jest dominujący.

Uzupełnieniem wyników badań przedstawionych w wyżej wymienionych publikacjach jest analiza zmian strukturalnych i funkcjonalnych w zbiorowiskach mikroorganizmów zasiedlających ryzosferę i fyllosferę malin w wyniku obecności fitopatogenów, a także aplikacji inokulumu pożytecznych bakterii. Wyniki te zostały przygotowane do publikacji i przedstawione w formie manuskryptu P.4: 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. Z zamieszczonych oświadczeń wynika, iż udział Doktoranta, podobnie jak w powyższych publikacjach był znaczący i obejmował analizę uzyskanych wyników, statystyczne i graficzne ich opracowanie oraz przygotowanie manuskryptu.

W skład złożonej dokumentacji, stanowiącej rozprawę doktorską (załącznik nr 1) i zatytułowanej "Opracowanie bakteryjnego kompleksu do naturalizacji ryzosfery malin" wchodzi:

- oświadczenie promotora i promotora pomocniczego rozprawy, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod ich kierunkiem i spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego;
- oświadczenie, że niniejsza rozprawa została napisana przez Doktoranta samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami oraz, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni i jest też identyczna z załączoną wersją elektroniczną;
- informacja o źródle finansowania badań wchodzących w skład pracy doktorskiej;

- streszczenie w języku polskim i angielskim;
- spis treści;
- lista publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej;
- wprowadzenie w problematykę badawczą i przegląd literatury dotyczącej zagadnień związanych z ryzosferą jako źródłem pożytecznych mikroorganizmów, wpływem pożytecznych mikroorganizmów na rośliny uprawne i fitopatogeny oraz rolę preparatów mikrobiologicznych w rolnictwie regeneracyjnym (21 stron);
- hipoteza badawcza;
- cele rozprawy doktorskiej;
- omówienie wyników przedstawionych w publikacjach i badaniach uzupełniających (29 stron);
- podsumowanie i wnioski (3 strony);
- kopie publikacji P.1, P.2 i P.3 (77 stron);
- tekst manuskryptu pracy P.4 (51 stron);
- bibliografia (10 stron);
- skany oświadczeń Doktoranta i współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (11 stron);
- aneks stanowiący życiorys naukowy (4 strony).

Część opisująca badania uzupełniające, stanowiące podstawę manuskryptu pracy P.4, ma formę zbliżoną do monografii i zawiera trzy rozdziały: wstęp, materiały i metody, wyniki i dyskusja, łącznie 23 strony. Wstęp naświetla problem badawczy i potrzebę realizacji badań nad określeniem wpływu inokulum bakterii pożytecznych na właściwości funkcjonalne oraz skład taksonomiczny zbiorowisk mikroorganizmów zasiedlających ryzosferę oraz fyllosferę malin w doświadczeniu wazonowym. Rozdział Materiały i metody został podzielony na 4 podrozdziały opisujące doświadczenie wazonowe, badania przeprowadzone na płytkach ECO systemu BiologTM, izolację DNA i sekwencjonowanie następnej generacji oraz analizę statystyczną. Natomiast rozdział Wyniki i dyskusja został podzielony na 7 podrozdziałów: 1) różnorodność funkcjonalna zbiorowisk mikroorganizmów; 2) względna obfitość typów bakterii i grzybów w ryzosferze malin; 3) liczba rzędów bakterii i grzybów w ryzosferze malin; 4) skład rdzeniowego mikrobiomu ryzosfery i fyllosfery malin; 5) bioróżnorodność mikroorganizmów bakteryjnych i grzybowych w ryzosferze i fyllosferze malin; 6) porównanie typów troficznych mikroorganizmów grzybowych zasiedlających ryzosferę malin; 7) analiza funkcjonalna zbiorowisk mikroorganizmów bakteryjnych zasiedlających ryzosferę malin.

Załącznik nr 1 obejmuje łącznie 210 stron i stanowi kompletną, uporządkowaną, klarowną i logicznie przedstawioną całość rozprawy doktorskiej. Warto podkreślić, iż część polskojęzyczna jest napisana poprawnie pod względem gramatycznym, stylistycznym i leksykalnym, jak również nie dostrzega się wyraźnych błędów zapisu, co nadaje tekstowi charakter odpowiednim do prac badawczych/naukowych, właściwy rozprawom doktorskim.

**Na podstawie przedstawionej dokumentacji stwierdzam, iż przyjęta i zaprezentowana forma dysertacji spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w myśl Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668, z późn. zm.).**

## **OCENA MERYTORYCZNA**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska, zatytułowana: „Opracowanie bakteryjnego kompleksu do naturalizacji ryzosfery malin” ma złożoną formę, a jej zasadniczą część stanowią trzy publikacje: P.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; P.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; P.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 oraz dwudziestotrzystostronicowy opis i przygotowany do publikacji pięćdziesięciojednostronicowy manuskrypt: P.4: 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.

Problematyka badawcza przedstawiona w rozprawie doktorskiej dotyczy ważnego problemu jakim jest opracowanie zrównoważonych i proekologicznych metod zarządzania chorobami roślin i dostarczenie wielofunkcyjnych narzędzi wspomagający ich plonowanie, a zarazem umożliwiających regenerację/bioremediację środowiska rolniczego. W publikacji przeglądowej P.1. Pan mgr inż. Michał Pylak przedstawił charakterystykę dostępnych komercyjnie biopreparatów opartych na ekstraktach roślinnych i z glonów, a także na składnikach pochodzenia zwierzęcego. Najszerzej opisał biopreparaty skomponowane na bazie pożytecznych mikroorganizmów. W publikacji tej omówił znaczenie i skalę rolnictwa ekologicznego w Europie i Polsce, a także problemy i wyzwania z jakimi zmagają się rolnicy decydujący się na produkcję owoców w sposób ekologiczny. Podkreślił też fakt istnienia zgodności ekologicznych praktyk rolniczych z obecnymi trendami promowanymi przez Unię Europejską, które zachęcają rolników do ograniczania chemicznych środków ochrony roślin i zastępowania ich biologicznymi środkami pochodzenia naturalnego. Pragnę tutaj podkreślić, iż przegląd literaturowy zawarty w pracy P.1 w sposób wyczerpujący opisuje obecny stan wiedzy w temacie i stanowi doskonały wstęp do niniejszej pracy doktorskiej. Warto również dodać, iż część z powyższych aspektów Doktorant omawia szerzej we wprowadzeniach do publikacji P.2, P.3, manuskryptu publikacji P.4 oraz w rozdziale Wstęp opisu badań uzupełniających.

Pan mgr inż. Michał Pylak w swojej pracy doktorskiej postawił pięć hipotez badawczych, które brzmią następująco:

- szczepy bakterii wyizolowane z ryzosfery malin dzikorosnących posiadają właściwości antagonistyczne skierowane przeciwko wybranym fitopatogenom grzybowym i grzybopodobnym owoców miękkich,
- szczepy bakterii wyizolowane z ryzosfery malin dzikorosnących posiadają bogate uzdolnienia metaboliczne oraz enzymatyczne,
- zoptymalizowane parametry podłoża hodowlanego oraz warunków hodowli, a także odpowiednio dobrana metoda prezerwacji pozwala na namnożenie oraz zachowanie aktywności komórek bakteryjnych,
- aplikacja inokulum wybranych izolatów bakterii pożytecznych wpływa pozytywnie na poprawę wzrostu roślin malin oraz aktywność mikroorganizmów glebowych w obecności fitopatogenów grzybowych i grzybopodobnych,
- aplikacja inokulum wybranych izolatów bakterii pożytecznych wpływa pozytywnie na bioróżnorodność mikroorganizmów i aktywność zbiorowisk mikroorganizmów glebowych.

Warto w tym miejscu zwrócić uwagę, iż hipotezy badawcze powinny być raczej definiowane na podstawie wyników dotychczasowych badań lub badań wstępnych, w tym własnych, a nie jak pisze Doktorant, cytując: „na podstawie przeglądu literatury dotyczącego obecnie stosowanych biopreparatów w uprawach owoców miękkich, aktualny problem z występowaniem i biokontrolą fitopatogenów grzybowych i grzybopodobnych w rolnictwie ekologicznym i regeneracyjnym, a także na wynikającą z tego potrzebę opracowywania nowych biopreparatów zawierających lokalnie występujące mikroorganizmy pożyteczne...”. Ponadto, hipoteza: „zoptymalizowane parametry podłoża hodowlanego oraz warunków hodowli, a także odpowiednio dobrana metoda prezerwacji pozwala na namnożenie oraz zachowanie aktywności komórek bakteryjnych” wydaje się być oczywista i raczej nie wymaga dodatkowego potwierdzenia naukowego.

Pan mgr inż. Michał Pylak zdefiniował cel główny swojej pracy doktorskiej, którym jest opracowanie biopreparatu mikrobiologicznego do naturalizacji ryzosfery malin oraz

określenie wpływu izolatów środowiskowych bakterii pożytecznych wchodzących w jego skład na rośliny malin, a także zbiorowiska oraz aktywność mikroorganizmów glebowych. Doktorant wyznaczył też pięć celów szczegółowych: 1) określenie zdolności izolatów środowiskowych bakterii pożytecznych do hamowania wzrostu wybranych fitopatogenów grzybowych i grzybopodobnych; 2) określenie uzdolnień metabolicznych wybranych bakterii pożytecznych; 3) optymalizacja składu podłoża hodowlanego, warunków hodowli oraz metody przerzucania dla wybranych izolatów bakterii pożytecznych, a także określenie składu prebiotycznej mieszanki suplementacyjnej dla wybranych izolatów bakterii pożytecznych oraz fitopatogenów grzybowych i grzybopodobnych; 4) określenie wpływu aplikacji inokulum wybranych izolatów bakterii pożytecznych na suchą masę części nadziemnych roślin malin, mokrą masę korzeni oraz aktywność dehydrogenaz; 5) określenie składu taksonomicznego zbiorowisk mikroorganizmów zasiedlających ryzosferę i fyllosferę roślin malin oraz wpływu inokulum bakterii pożytecznych na te zbiorowiska w warunkach kontaminacji przez wybrane fitopatogeny.

Sposób, w jaki zostały zrealizowane powyższe cele badawcze Doktorant przedstawił w publikacjach P.2, P.3 oraz manuskrypcie P.4 przygotowanym do publikacji, a także w 23-stronnicowym opisie badań uzupełniających.

Na podstawie doświadczeń opisanych w pracy P.2 pozyskano z gleby ryzosferowej i korzeni malin dzikorosnących 65 szczepów bakterii, które na podstawie analizy sekwencji regionu 16S rDNA zaklasyfikowano do 21 rodzajów. W oparciu o dane literaturowe 42 szczepy określono jako potencjalnie pożyteczne i wytypowano do badań, mających na celu zidentyfikowanie szczepów o właściwościach antagonistycznych względem kluczowych patogenów owoców miękkich. Wyselekcjonowano 8 szczepów bakterii - *Arthrobacter* sp. B58/18 i B49/18, *Pseudomonas* sp. B25/18 i B37/18, *Bacillus* sp. B39/18 i B40/18, oraz *Rhodococcus* sp. B12/18 i B73/18 zdolnych do hamowania wzrostu fitopatogenów z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Phytophthora* i *Verticillium*. Analizy z wykorzystaniem testów API ZYM oraz systemu BiologTM i płytek GEN III wykazała istnienie zróżnicowania na poziomie zakresu aktywności enzymatycznej i metabolicznej pomiędzy badanymi szczepami bakterii. Dodatkowo, na podstawie analizy z użyciem płytek GEN III oceniono zdolność szczepów bakterii do wzrostu w obecności czynników stresowych. W pracy P.2 na podstawie wyliczenia wskaźnik stresu substratowego (SST) wytypowano także cztery związki chemiczne: kwas  $\alpha$ -ketoglutarynowy, kwas jabłkowy, N-acetylo-D-glukozamina oraz kwas glutarynowy, jako indukujące wzrost pożytecznych bakterii, a zarazem wywołujące stres substratowy u badanych patogenów grzybowych. Związki te uznano za podstawowe składniki do opracowania prebiotycznej mieszanki suplementacyjnej wspierającej wzrost szczepów bakterii.

#### **Pytania, uwagi i komentarze:**

- W podpisie Figury 2 użyto sformułowania „The evolutionary history of...”. Proponowałabym zastąpić to określeniem „Phylogenetic three” ponieważ pierwsze sformułowanie odnosi się do badań ewolucyjnych i użycie tego sformułowania w kontekście prezentowanej tutaj tematyki, a także zakresu analiz, ilość i różnorodność badanych izolatów nie jest odpowiednie.
- w Tabeli A1 dwa szczepy – B29/18 i B60/18 opisano jako nie-zidentyfikowane – jak ten wynik potraktowano przy zasadzie selekcji szczepów/gatunków o znanej, potencjalnie pożytecznej ich roli względem roślin?;
- analizę jakich markerów filogenetycznych można zaproponować, by zidentyfikować badane szczepy na poziomie gatunku?;
- w doświadczeniu wyselekcjonowano 8 szczepów o najwyższym potencjale antagonistycznym względem fitopatogenów z rodzajów *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Phytophthora*, *Verticillium*, które następnie analizowano pod kątem zdolności metabolicznych; do analizy zdolności enzymatycznych wybrano natomiast już tylko 3 szczepy: *Rhodococcus* sp. B12/18, *Pseudomonas* sp. B37/18 i *Arthrobacter* sp. B58/18; proszę wyjaśnić jakimi kryteriami się sugerowano przy selekcji tych 3 szczepów.
- proszę wyjaśnić ideę stosowania do hodowli bakterii podłoża PDA (Potato dextrose agar) dedykowanego głównie dla grzybów.

Badania przedstawione w publikacji P.3 mają charakter wysoce aplikacyjny i opisują proces optymalizacji składu i pH podłoża hodowlanego oraz temperatury hodowli dla wybranych szczepów bakterii - *Rhodococcus* sp. B12/18 (GenBank: MW255650), *Pseudomonas* sp. B37/18 (GenBank: MW255651), *Arthrobacter* sp. B58/18 (GenBank: MW255652) i *Rhodococcus* sp. B75/18 (GenBank: MW255653), a także przedstawiają wyniki wpływu dodatku prebiotycznej mieszanki suplementacyjnej na wzrost gęstości optycznej hodowli bakterii. Praca ta przedstawia również rezultaty optymalizacji metod prezerwacji mikroorganizmów poprzez suszenie konwencjonalne, suszenie próżniowe oraz liofilizację. Analizowano także trzy metody przygotowania prób do suszenia. Ważnym aspektem opisanym w publikacji P.3 jest dokonana przez mgr. inż. Michała Pylaka ocena wczesnego efektu aplikacji konsorcjum bakteryjnego na rośliny malin i parametry gleby w doświadczeniu wazowym. W badaniu tym Doktorant zastosował 5 wariantów zakażenia roślin szczepami patogenów - *Botrytis cinerea* G277/18, *Verticillium* sp. G296/18, *Colletotrichum acutatum* G172/18 oraz *Phytophthora* sp. G408/18. Dla każdego wariantu zakażenia zastosował 4 strategie naturalizacji, które obejmowały inokulację korzeni malin podczas sadzenia, podlewanie roślin zawiesiną bakterii 4 tygodnie po posadzeniu, inokulację korzeni podczas sadzenia jak i podlewanie zawiesiną bakterii 4 tygodnie po posadzeniu oraz kontrolę bez naturalizacji. Ocena obejmowała natomiast analizy fizykochemiczne roślin i gleby. Analizowano także suchą masę części nadziemnych, wysokość i ilość rozgałęzień oraz świeżą masę korzeni roślin. Dodatkowo Doktorant badał aktywność dehydrogenazy w próbkach gleby.

#### **Pytania, uwagi i komentarze:**

- proszę wyjaśnić kryteria jakie stosowano przy selekcji 4 szczepów bakteryjnych: *Rhodococcus* sp. B12/18, *Pseudomonas* sp. B37/18, *Arthrobacter* sp. B58/18 i *Rhodococcus* sp. B75/18?
- w publikacji podano, że doświadczenie w fitotronie trwało dwa miesiące; brak jest natomiast informacji w jakim stadium rozwojowym inokulowano rośliny mikroorganizmami i w jakim stadium pobierano próby (ile dni po inokulacji)
- w jaki sposób dokonano optymalizacji/wyboru stężenia zarodników grzybów patogenicznych do badań oraz zakresu gęstości optycznej pożytecznych bakterii stosowanych jako inokulum?
- czy oprócz świeżej masy korzeni dokonano pomiarów suchej masy, a także długości korzeni i ilości korzeni bocznych?; czy analizowano również wpływ inoculum na plonowanie roślin?.

Uzupełnieniem opublikowanych już prac była natomiast analiza zmian strukturalnych i funkcjonalnych w zbiorowiskach mikroorganizmów zasiedlających ryzosferę i fyllosferę malin w wyniku obecności fitopatogenów i po zastosowaniu inokulum pożytecznych bakterii. Pan mgr inż. Michał Pylak zastosował w tym badaniu taki sam jak opisano powyżej schemat doświadczenia. Dla wszystkich zastosowanych wariantów zakażenia i strategii naturalizacji Doktorant wykonał analizę różnorodności funkcjonalnej mikroorganizmów występujących w glebie ryzosferowej i fyllosferze roślin z użyciem płytek ECO systemu BiologTM. Na tej podstawie oszacował również wartość wskaźnika stresu substratowego. Wykorzystanie wysokoprzepustowego sekwencjonowania pozwoliło na określenie struktury zbiorowisk mikroorganizmów glebowych i wskazania różnice w ich składzie taksonomicznym w zależności od poszczególnych strategii naturalizacji i patosystemów oraz zdefiniowania mikrobiomu rdzeniowego (ang. core microbiome) ryzosfery i fyllosfery malin. Za pomocą wskaźnika różnorodności Shannona, równości Pielou i różnorodności filogenetycznej Faitha Doktorant ocenił także dla każdej strategii naturalizacji i patosystemu stopień bioróżnorodności bakterii i grzybów w fyllosferze i ryzosferze malin. Za pomocą narzędzia FUNGuild, Pan mgr inż. Michał Pylak zidentyfikował ponadto typy troficzne grzybów obecnych w próbkach ryzosfery i fyllosfery malin. Natomiast na podstawie analizy zidentyfikowanych wariantów sekwencji amplikonu (ang. Amplicon Sequence Variant, ASV) przeprowadzonej z wykorzystaniem środowiska PICRUSt i bazy KEGG Doktorant określił profil funkcjonalny zbiorowisk bakterii występujących w próbach z ryzosfery malin poddanych różnym strategiom naturalizacji i wariantom infekcji patogenami.

### **Pytania, uwagi i komentarze:**

- czy analiza sekwencjonowania z użyciem platformy Illumina MiSeq została wykonana samodzielnie przez Doktoranta, czy w ramach usługi zewnętrznej?
- podając wskaźniki bioróżnorodności warto wskazać referencje;
- czy w doświadczeniu wykorzystano jedną odmianę malin, a jeśli tak, to jak w kontekście tej jednej odmiany i różnych strategii naturalizacji oraz inokulacji 4 gatunkami patogenów jest rozumiany „core microbiome” ryzosfery malin?
- na ile narzędzie FUNGuild jest wiarygodne w oszacowaniu typów troficznych grzybów, czy weryfikowano te dane doświadczalnie? – proszę o komentarz

### **Drobne uwagi edytorskie dotyczące całości rozprawy doktorskiej:**

- istnieje zasada, według której zdania nie powinno rozpoczynać się od liczby zapisanej cyfrą – str. 137;
- pełną nazwę gatunkową, łacińską podajemy w danym tekście tylko za pierwszym jej cytowaniem;
- proponuję zastąpić wyrażenie „uzdolnienie” (uzdolnienie metaboliczne) słowem „zdolność”, ponieważ to pierwsze ma wyraźną formę personifikacji.

Na podstawie przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników pan mgr inż. Michał Pylak sformułował 10 wniosków. Pragnę jednak zauważyć, iż tylko część z tych sformułowań lub ich fragmenty mają charakter wniosków. Większość z nich brzmi raczej jak podsumowanie wyników, np. część wniosku nr 1 i 4 oraz wniosek nr 2, 5, 7, 8 w kolejności. Przy tak obszernej pracy i ogromnej liczbie wyników warto sformułować osobno podsumowanie i osobno wnioski.

Przed wyrażeniem ostatecznej opinii na temat merytoryki rozprawy doktorskiej pana mgr. inż. Michała Pylaka, pragnę podkreślić, że publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały już wcześniej poddane merytorycznej ocenie przez międzynarodowych specjalistów w danej dziedzinie wiedzy oraz komitetów redakcyjnych czasopism prezentujących uznany, wysoki poziom naukowy. Dlatego też wszystkie zamieszczone uwagi i komentarze do tych prac wskazują raczej na potrzebę dodatkowego wyjaśnienia lub uzupełnienia pewnych zagadnień, czy też rozwinięcia dyskusji nad niektórymi, bardzo interesującymi w moim odczuciu, wątkami pracy. Nie umniejszają natomiast wysokiego poziomu badań i wartości uzyskanych wyników. Natomiast w przypadku badań uzupełniających warto uwzględnić wszelkie uwagi i komentarze przy przeredagowywaniu manuskryptu.

W ramach pracy doktorskiej Pan mgr inż. Michał Pylak podjął się bardzo ambitnego zadania jakim jest opracowanie biopreparatu na bazie bakterii o charakterze neutralizującym ryzosferę malin. Zadanie to choć ma wyraźny wydźwięk aplikacyjny, to jednak jego wykonanie doprowadziło do uzyskania bardzo ważnych wyników obejmujących rozpoznanie mikrobiomu dzikorosnących malin, pozyskania i scharakteryzowania bakterii zasiedlających te rośliny, wyselekcjonowania szczepów o pożądanych z ekologiczno-rolniczego punktu widzenia właściwościach, a ostatecznie zidentyfikowania czynników determinujących zmiany w strukturze i funkcjonowaniu mikrobiomu malin. **Za najważniejsze w moim odczuciu wyniki uważam:**

- wyizolowanie z gleby ryzosferowej i korzeni malin dzikorosnących 65szczepów bakterii i zaklasyfikowanie ich do 21 rodzajów;
- zidentyfikowanie czterech szczepów bakterii - *Rhodococcus* sp. B12/18 (GenBank: MW255650), *Pseudomonas* sp. B37/18 (GenBank: MW255651), *Arthrobacter* sp. B58/18 (GenBank: MW255652), *Rhodococcus* sp. B75/18 (GenBank: MW255653) o potencjale antagonistycznym względem kluczowych patogenów roślin owoców miękkich;
- otrzymanie funkcjonalnego preparatu bakteryjnego poprzez ustalenie warunków hodowli (pH w zakresie od 7 do 8, temp. w zakresie od 24 do 30°C), składu podłoża hodowlanego (3%

sacharoza jako źródło węgla i 6% azotan amonu jako źródło azotu) oraz metody prezerwacji (suszenie próżniowe) wchodzących w jego skład bakterii;

- ustalenie składu prebiotycznej mieszanki suplementacyjnej skomponowanej z kwasu  $\alpha$ -ketoglutarynowego, kwasu jabłkowego, kwasu glutarynowego i N-acetylo-D-glukozaminy, której 1% dodatek do podłoża hodowlanego indukuje wzrost pożytecznych szczepów bakterii *Rhodococcus* sp. B12/18, *Pseudomonas* sp. B37/18, *Arthrobacter* sp. B58/18 i *Rhodococcus* sp. B75/18;

- udokumentowanie pozytywnego wpływu inokulacji roślin pożytecznymi bakteriami na aktywność dehydrogenaz glebowych i funkcjonowanie mikrobiomu zasiedlającego ryzosferę malin przy obecności inokulum grzybów patogennych;

- udokumentowanie wpływu inokulacji roślin pożytecznymi bakteriami na wartość/obniżenie wskaźnika stresu substratowego dla mikroorganizmów zasiedlających fytosferę malin;

- udokumentowanie wpływu inokulacji roślin pożytecznymi bakteriami na bioróżnorodność (wskaźnik różnorodności Shannona) grzybów zasiedlających ryzosferę malin, w tym patogennych;

- wykazanie, iż dzikorosnące, lokalnie występujące rośliny mogą stanowić doskonałe źródło pożytecznych mikroorganizmów;

- potwierdzenie konieczności opracowywania celowanych biopreparatów, uwzględniających specyficzność genotypu roślin i zasocjowanych z nią mikroorganizmów, w tym tych patogennych i pożytecznych.

## PODSUMOWANIE

Na podstawie przedstawionej dokumentacji stwierdzam, iż tematyka pracy doktorskiej mgr. inż. Michała Pylaka jest oryginalna, a wyniki uzyskane podczas jej realizacji są ważne i interesujące dla badaczy zajmujących się szeroko rozumianą mikrobiomiką roślin. Zrealizowane w ramach niniejszej pracy doktorskiej badania i jej efekty mogą być istotnym punktem w pracach dotyczących wielokierunkowych oddziaływań roślin z mikroorganizmami pożytecznymi i patogennymi, jak również związanych z poznaniem czynników determinujących skład i funkcjonowanie mikrobiomów roślinnych i glebowych. Z dużym uznaniem odnoszę się też do wyników o charakterze aplikacyjnym. Stwierdzam, iż opracowanie prototypu tak wielofunkcyjnego biopreparatu jest ważnym osiągnięciem. Biorąc natomiast pod uwagę udział Doktoranta we wszystkich wchodzących w skład rozprawy doktorskiej publikacjach i badaniach, który jest dominujący i obejmuje nie tylko aspekty badawcze, ale również interpretację wyników i przygotowywanie manuskryptów do publikacji, można wnioskować o dużej samodzielności i dojrzałości naukowej Pana mgr. inż. Michała Pylaka i jego gotowości do podjęcia dalszej pracy badawczej.

**Stwierdzam, że oceniana dysertacja spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668, z późn. zm.). W szczególności stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Pana mgr. inż. Michała Pylaka w zakresie dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo oraz umiejętność prowadzenia przez niego pracy naukowej. Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie o dopuszczenie Pana mgr. inż. Michała Pylaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**