

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Moniki Patrycji Kaczor

„Wykorzystanie odpadów po hodowli *Hermetia illucens* jako bionawozów”

Imię i nazwisko kandydatki: mgr Monika Patrycja Kaczor

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Wykorzystanie odpadów po hodowli *Hermetia illucens* jako bionawozów”

Promotor: Prof. dr hab. inż. Andrzej Bieganowski

Promotor pomocniczy: dr inż. Piotr Bulak

Recenzent: Prof. dr hab. Ewa Dubas, prof. IFR PAN

Wartość naukowa podjętej problematyki w rozprawie.

Oryginalność badań.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska podejmuje niezwykle aktualną, ważną społecznie i wybitnie interdyscyplinarną problematykę badawczą, która wpisuje się w globalną strategię rozwoju gospodarki o obiegu zamkniętym oraz założeń zrównoważonego rozwoju rolnictwa. Główna oś naukowa dysertacji koncentruje się wokół wieloaspektowego wykorzystania oraz waloryzacji biomasy, odchodów i pozostałości podłoża (tzw. frassu) pochodzących z masowej hodowli larw muchy czarnej (*Hermetia illucens*, BSF). W dobie konieczności redukcji nawożenia syntetycznego oraz poszukiwania alternatywnych, bezpiecznych biologicznie źródeł białka i energii, badania nad owadami, jako wydajnymi biokonwerterami biomasy odpadowej nabierają szczególnego znaczenia. Doktorantka w swojej pracy w sposób dojrzały i kompleksowy udowadnia, że larwy *H. illucens* są zdolne do wydajnej utylizacji skrajnie trudnych substratów, w tym resztek warzywno-owocowych, obornika, osadów biogazowych, a nawet osadów ściekowych. Co niezwykle istotne, z punktu widzenia nauk rolniczych i technologii żywności i żywienia, uzyskiwana biomasa owadzia, jest wysokobiałkowa (32–58%) i bogata w tłuszcze (15–39%), stanowiąc pełnowartościową alternatywę paszową w żywieniu drobiu, trzody chlewnej, ryb oraz zwierząt domowych. Równoległe autorka dotyka sfery biopolimerowej i energetycznej, wskazując na wyniki jako cenne źródło chityny oraz chitozanu dla sektorów kosmetycznego i medycznego, a tłuszcz wadzi pozycjonując jako surowiec do syntezy biodiesla. Z perspektywy metodologicznej i analitycznej rozprawa wnosi istotne, nowe spojrzenie na mechanizmy biologicznego bezpieczeństwa i ekofizjologii.

Pionierskim i najbardziej fascynującym dla fizjologa roślin elementem dysertacji są badania nad entomoremediacją zanieczyszczeń organicznych oraz mechanizmami biostymulacji roślin przy użyciu produktów poowadziech. Autorka udowadnia, że larwy *H. illucens* skutecznie degradują uciążliwe toksyny grzybowe obecne w substratach odpadowych, zapobiegając ich akumulacji w biomasie, co ma kluczowe znaczenie dla biologicznego bezpieczeństwa całego procesu recyklingu. Uzyskany w tym procesie bionawóz (frass) oraz powstające odcieki hodowlane zostają w pracy zdefiniowane nie tylko jako tradycyjne, bezpieczne źródło makroskładników (N:P:K), ale przede wszystkim jako potencjalne, zaawansowane biostymulatory metabolizmu roślin. Doktorantka słusznie redefiniuje rolę frassu w nowoczesnej agrochemii, wykazując, że jego unikalna aktywność wynika z synergistycznego

działania obecnej w wylinkach chityny (pełniącej funkcję elicytora odporności roślin) oraz bezprecedensowego bogactwa fitohormonów, generowanych m.in. na drodze sukcesji mikrobiologicznej bakterii promujących wzrost. Aplikacja tych produktów poowadziła w sposób mierzalny stymuluje aparat fotosyntetyczny, rozwój systemu korzeniowego oraz aktywność enzymatyczną gleby, prowadząc do optymalizacji przyrostu biomasy roślin uprawnych przy jednoczesnym łagodzeniu skutków stresów środowiskowych. W tym kontekście podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza stanowi spójną i oryginalną odpowiedź na współczesne wyzwania ekotoksykologii i zrównoważonej agrotechniki.

Poprawność i redakcyjna rozprawy i wskaźniki parametryczne.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska spełnia wszystkie obowiązujące standardy stawiane dysertacjom akademickim. Układ pracy jest logiczny, poprawny pod względem metodologicznym. Autorka zachowuje normy przygotowania i redagowania tekstu naukowego. Pracę przygotowano w formie autoreferatu o objętości 157 stron, który obejmuje: oświadczenia promotora, promotora pomocniczego oraz Autorki, streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz publikacji wchodzących w skład doktoratu, wstęp, cele pracy i hipotezy badawcze, rozdział materiałowo-metodyczny, omówienie wyników, a także podsumowanie badań i wnioski. Część wyników stanowi spójny tematycznie cykl czterech opublikowanych artykułów naukowych (Publikacje P1–P4), w tym jedna praca przeglądowa (P1) oraz trzy oryginalne prace eksperymentalne (P2–P4). Autoreferat zawiera również informacje o źródłach finansowania badań, spis cytowanej literatury, pełne teksty (pliki PDF) publikacji oraz szczegółowe oświadczenia Doktorantki i współautorów określające ich procentowy i merytoryczny udział w poszczególnych dziełach. W skład rozprawy wchodzi cztery wieloautorskie, oryginalne prace opublikowane w latach 2023–2026. Zostały one wydane w renomowanych czasopismach o wysokich współczynnikach oddziaływania (ang. Impact Factor, IF), wynoszących od 3,80 do 10,00 (łącznie IF = 26,9; sumaryczna liczba punktów MNiSW = 510). Doktorantka jest pierwszym i głównym autorem wszystkich czterech publikacji indeksowanych w bazie Web of Science Core Collection oraz ujętych w Journal Citation Reports. W żadnej z prac nie pełniła ona funkcji autora korespondencyjnego, co w przypadku realizacji tak licznych i ambitnych zadań przez kiluosobowy zespół badawczy jest rzeczą naturalną i powszechną w obszarze nauk przyrodniczych oraz rolniczych. Z przedłożonych oświadczeń współautorskich można precyzyjnie wyodrębnić rzeczywiste, kluczowe działania zrealizowane przez Doktorantkę. Brała ona czynny udział w współtworzeniu koncepcji badań, samodzielnie przeprowadziła większość pomiarów laboratoryjnych, dokonała krytycznego przeglądu literatury (ze wsparciem współautorów), a także opracowała statystycznie i graficznie uzyskane wyniki. Ponadto przygotowała pierwsze wersje manuskryptów, nanosiła korekty sugerowane przez pozostałych badaczy, a w procesie recenzenckim sporządziła wstępne wersje odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz ostateczne wersje prac do druku. Współautorzy każdego z artykułów w pełni zaakceptowali wkład Doktorantki w powstanie dzieła, co zwyczajowo odzwierciedla kolejność nazwisk na listach autorskich oraz stosowne, ujęte w przypisach atrybucje.

Wartość merytoryczna rozprawy.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Moniki Patrycji Kaczor stanowi spójny tematycznie cykl publikacji dotyczących zagadnienia pt. „Wykorzystanie odpadów po hodowli *Hermetia illucens* jako bionawozów”. Temat pracy doktorskiej jest niezwykle interesujący ze względu na nowatorski model eksperymentalny pozwalający na uzyskanie szeregu unikalnych informacji o właściwościach agrochemicznych, sanitarnych oraz fitofizjologicznych frassu i odcieków hodowlanych, w tym m.in. o ich potencjale biostymulacyjnym i zdolności do

entomoremediacji mykotoksyn. Składający się na rozprawę doktorską cykl czterech opublikowanych artykułów naukowych – w tym jedna praca przeglądowa (P1) oraz trzy oryginalne prace eksperymentalne (P2–P4) – jest tematycznie spójny, a tytuł rozprawy wprost odzwierciedla aplikacyjny i środowiskowy wymiar podjętych badań. Ze względu na fakt, iż opublikowane artykuły zostały uprzednio poddane rygorystycznej ocenie przez edytorów i recenzentów renomowanych czasopism, niniejsza recenzja koncentruje się przede wszystkim na ocenie autoreferatu, będącego autorskim podsumowaniem uzyskanych wyników poddanych dyskusji w świetle dostępnej literatury światowej. Streszczenie rozprawy zawiera krótkie wprowadzenie w problematykę badawczą, cel pracy i uzyskane wyniki w perspektywie potencjalnych praktycznych korzyści dla zrównoważonego rolnictwa.

Dziewięciostronicowy wstęp rozprawy obejmuje syntetyczny przegląd literatury poświęconej definiowaniu i charakterystyce biologii *Hermetia illucens*, ze szczególnym uwzględnieniem roli roślin strączkowych jako głównego źródła białka w modelach żywieniowych i hodowlanych. Autorka w sposób usystematyzowany osadza te zagadnienia w realiach nowoczesnej gospodarki cyrkularnej (obiegu zamkniętego), pozycjonując bioremediację jako fundamentalny element tego systemu, służący ekologicznej waloryzacji biomasy. W tym kontekście Doktorantka trafnie definiuje entomoremediację jako wyspecjalizowaną gałąź bioremediacji, opierającą się na wykorzystaniu unikalnego aparatu metabolicznego owadów do oczyszczania i redukcji uciążliwych substratów odpadowych. W dalszej części omówione zostały bionawozy, jako efektywny sposób na zagospodarowanie i recykling trudnych odpadów rolniczych, wyprowadzając zwięzłe tło dla analizy zawartych w nich fitohormonów, które w roztworze glebowym pełnią kluczową funkcję naturalnych biostymulatorów wzrostu i rozwoju roślin wyższych.

Cele pracy i hipotezy badawcze zostały sformułowane i przedstawione w sposób przejrzysty, precyzyjnie definiując ramy metodologiczne podjętego problemu. Kolejny rozdział rozprawy zawiera szczegółowy opis materiałów i metod wykorzystanych do realizacji poszczególnych zadań badawczych. W sekcji tej Autorka charakteryzuje procedury związane z prowadzeniem hodowli *Hermetia illucens*, przebieg samych doświadczeń eksperymentalnych oraz zaawansowane metody analityczne, w tym między innymi precyzyjnie opisane techniki laboratoryjne do oznaczania obecności mykotoksyn i ich metabolitów, a także wysoce czuła analiza profilu fitohormonów. Rozdział ten zamyka poprawnie skonstruowany opis zastosowanych metod analizy statystycznej uzyskanych wyników, co potwierdza rzetelność i powtarzalność prezentowanych badań.

Mimo ogólnej, zdecydowanie **pozytywnej oceny recenzowanej pracy**, zwracam uwagę, że w obrębie Rozdziału 5, w celu podniesienia przejrzystości i spójności wyводу, cennym rozwiązaniem byłoby zdefiniowanie w strukturze tekstu głównych frakcji produktowych uzyskiwanych z hodowli *Hermetia illucens*, a dopiero w ich obrębie, w formie dedykowanych podrozdziałów, szczegółowe omówienie konkretnych aplikacji przemysłowych. Pozwoliłoby to uniknąć obecnego w Rozdziale 5, nieco chaotycznego zestawiania w jednym rzędzie procesów technologicznych (np. *Biokonwersja biomasy odpadowej*), rynków zbytu (np. *Pasza dla zwierząt, Środki kosmetyczne*), konkretnych biokomponentów (np. *Chityna i chitozan*) czy produktów ubocznych (np. *Frass*). Zamiast tego typu redundancji, w spisie treści, gdzie przykładowo zagadnienia takie jak *Właściwości przeciwdrobnoustrojowe, Entoremediacja czy Frass* stanowią osobne podrozdziały, bardziej przejrzysta byłaby struktura oparta na czterech filarach produktowych: biomacie białkowej (obejmującej zastosowanie spożywcze i paszowe, cechy bioaktywne oraz syntezę bioplastyków), tłuszczu owadzi (z podrozdziałami o biodieslu, biogazie i kosmetykach), chitynie/chitozanie (w ujęciu zastosowania jako powierzchni sorpcyjnych, w biosensorach i materiałach biomedycznych) oraz frassie, traktowanym jako

odrębna frakcja nawozowa. Uwaga ta ma charakter wyłącznie metodologicznej refleksji i w żaden sposób nie umniejsza wysokiej wartości naukowej prezentowanego dzieła.

Mając na uwadze przyszłą działalność publikacyjną Autorki, sygnalizuję dwie drobne uwagi. Po pierwsze, zastosowanie w pracy dedykowanego wykazu skrótów, znacząco ułatwiłoby czytanie i percepcję całego tekstu, jako że przykładowo na stronie 42 w Tabeli 3 użyto niewyjaśnionego akronimu „BSFL”, który metodologicznie powinien zostać wprowadzony już w Rozdziale 2 (*Wprowadzenie*); po drugie, niektóre sformułowania stanowiące język techniczno-prawny zawierają z biologicznego punktu widzenia pewien poziom nadmiarowości, co ilustruje opis wydajności biometanu w Tabeli 4 na stronie 43, gdzie mowa o surowcach, którymi żywiły się „*całe owady lub ich części, a później wymienione larwy*”, podczas gdy pod kątem precyzji definicyjnej znacznie bardziej przejrzysta i poprawna biologicznie byłaby formuła: „*dorosłe owady, ich larwy lub ich części*”. Wskazane usterki mają jednak charakter wyłącznie edytorski, są łatwe do skorygowania.

Niezalenie od powyższego, w odniesieniu do wspomnianego podrozdziału poświęconego frassowi, Doktorantka omawia niezwykle intrygujące wyniki badawcze, które stają się przyczynkiem do sformułowania pytania na obronę rozprawy. Z tekstu wynika bowiem, że niefiltrowany ekstrakt z larw uzyskany z hodowli na kontrolnej diecie Gainesville bardzo efektywnie hamował wzrost licznych grzybní różnicowanych patogenów roślinnych, podczas gdy ekstrakt z larw karmionych substratami odpadów owocowo-warzywnych oraz piekarniczobrowarnianych ograniczał rozwój zaledwie dwóch-trzech z nich. Jednocześnie Autorka słusznie zwraca uwagę na potrzebę ścisłej kontroli mikrobiologicznej tego produktu ze względu na ryzyko namnażania się w nim bakterii z rodziny Xanthomonadaceae o potencjale fitopatogennym. W związku z tym zwracam się do Autorki z **pytaniem**: „*Jak, w świetle opisanych wyników, ocenia Pani realną wartość aplikacyjną frassu jako nawozu o właściwościach fitosanitarnych? Z czego wynika fakt, że podłoże stymulujące silną oporność przeciwgrzybiczą sprzyjało jednocześnie rozwojowi potencjalnie niebezpiecznych bakterii Xanthomonadaceae, i jakie konkretne metody kontroli lub uszlachetniania frassu rekomendowałyby Pani w celu eliminacji tego ryzyka przy zachowaniu jego unikalnych właściwości antagonistycznych wobec grzybów?*” Odpowiedź na to pytanie pozwoli pełniej naświetlić mechanizm tego zjawiska oraz ocenić komercyjny potencjał opisywanego nawozu owadziego.

Bezpośrednio za tym wątkiem Autorka opisuje zaobserwowane efekty nawozowe, wskazując na bardzo interesującą zależność fizjologiczną u testowanych roślin: aplikacja frassu przełożyła się na wyraźny wzrost zawartości chlorofilu oraz większą powierzchnię liści, co ostatecznie zmanifestowało się istotnym przyrostem suchej masy roślin, przy jednoczesnym braku tak wyraźnego wpływu na ich świeżą masę. W powiązaniu z tym zjawiskiem formułuję **drugie pytanie** do Autorki: „*Jak z perspektywy fizjologii i gospodarki wodnej rośliny tłumaczy Pani ten mechanizm? Dlaczego większa powierzchnia asymilacyjna oraz wyższy indeks zazielenienia liści (chlorofilu) zastymulowały głównie wzrost suchej masy, a nie wpłynęły w równym stopniu na uwodnienie tkanek (świeżą masę)?*” Wyjaśnienie tej korelacji pozwoli na głębsze zrozumienie wpływu frassu na metabolizm pierwotny roślin.

W mojej ocenie, jako Recenzentki, zaobserwowany wynik można tłumaczyć faktem, że bogaty w azot i magnez frass stymuluje syntezę chlorofilu i zwiększa wydajność fotosyntezy, co prowadzi do intensywnej produkcji asymilatów i budowy struktur komórkowych (stąd wzrost suchej masy). Jednocześnie większa powierzchnia liści potęguje transpirację (parowanie wody), a wysoka przewodność elektryczna (EC) i zasolenie podłoża ograniczają nadmierne uwodnienie tkanek, co w efekcie nie przekłada się na przyrost świeżej masy. Hipotezę tę doskonale uwierzytelniają dane przedstawione przez Autorkę w Tabeli 9, gdzie wykazano, że w dojrzałym frassie uzyskanym z substratów strączkowych (grochu i fasoli) znajduje się

statystycznie najwięcej jonów (Mg^{2+}) oraz tlenu (MgO). Ponieważ Mg jest centralnym atomem w cząsteczce chlorofilu, tak wysoka jego koncentracja w tych konkretnych próbach w pełni uzasadnia zaobserwowany później skokowy wzrost indeksu zieloności liści oraz intensyfikację metabolizmu węgla u testowanych roślin. Co ważne, Autorka odnotowała przy tym brak istotnych statystycznie różnic w zawartości jonów sodu (Na^+) między badanymi wariantami, co pozwala przypuszczać, że to właśnie specyficzna koncentracja makroskładników odżywczych (takich jak magnez), a nie fitotoksyczny nadmiar sodu, stymulowała ten unikalny balans biomasy roślinnej.

W tym miejscu zmuszona jestem jednak sformułować drobną uwagę krytyczną dotyczącą poprawności nomenklatury tekstu. W analizowanym rozdziale (Tabele 7, 9) Autorka omyłkowo zaklasyfikowała jony Na^+ do grupy mikroelementów. Z punktu widzenia fizjologii roślin oraz agrochemii, sód (Na), choć dla wielu gatunków uprawnych definiowany jako pierwiastek jedynie pożyteczny, a nie bezwzględnie konieczny, ze względu na wysokie stężenia w tkankach i specyfikę akumulacji, zaliczany jest jednoznacznie do makroelementów (podobnie jak potas czy wapń). Błąd ten ma o tyle istotne znaczenie merytoryczne, że to właśnie wysoka zawartość Na jako makroelementu we frassie bezpośrednio determinuje wspomnianą wcześniej przewodność elektryczną (EC) podłoża i kształtuje gospodarkę wodną roślin. Choć pomyłka ta nie podważa ogólnej, wysokiej wartości naukowej prezentowanych badań, to wymaga ona na przyszłość korekty.

Dalsze podrozdziały rozprawy w sposób bardzo interesujący poruszają coraz szersze możliwości aplikacyjne *Hermetia illucens*, jako np. niezwykle obiecujące źródło cennych składników dla przemysłu kosmetycznego oraz produktów higieny osobistej. Autorka słusznie zwraca uwagę na bogaty profil aminokwasowy białka owadziego, upatrując w nim potencjału do wspierania syntezy kolagenu czy głębokiego nawilżania skóry. W tej partii tekstu pojawia się jednak pewna nieścisłość merytoryczna o charakterze biochemicznym, polegająca na przypisaniu aminokwasom budującym to białko, w szczególności glicynie i glutaminie, bezpośrednich właściwości antyoksydacyjnych (przeciwutleniających). Z punktu widzenia fizjologii jest to niefortunny skrót myślowy. Reszty aminokwasowe glutaminy i glicyny w łańcuchu białkowym, same w sobie, nie posiadają zdolności do bezpośredniej neutralizacji reaktywnych form tlenu (nie działają jako bezpośrednie „zamiatacze” wolnych rodników). Ich rola w antyoksydacyjnym systemie obronnym ma charakter ściśle pośredni. Stanowią one bowiem cenny rezerwuar budulcowy (są prekursorami), który po hydrolizie białka dostarcza komórkom substratów niezbędnych do wewnątrzkomórkowej syntezy właściwych antyoksydantów, takich jak tripeptyd glutation (w zredukowanej formie - GSH), bądź wspiera ekspresję enzymów ochronnych, w tym dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Warto zatem na przyszłość pamiętać o precyzyjnym rozróżnianiu bezpośredniego działania antyoksydacyjnego od pośredniego wspierania wewnętrznej tarczy przeciwutleniającej, co pozwoli na jeszcze dokładniejsze naświetlenie tego ciekawego mechanizmu w publikacjach naukowych Autorki.

Ogromną zaletą recenzowanej pracy jest interdyscyplinarne i wieloaspektowe podejście Autorki do analizy potencjału aplikacyjnego pozostałych kluczowych frakcji pozyskiwanych z hodowli *Hermetia illucens*. Wysoką wartość merytoryczną przedstawia charakterystyka właściwości fizykochemicznych chityny i jej pochodnych. Autorka trafnie identyfikuje i opisuje jej unikalne cechy tego biopolimeru, do których należą wysoka biogodność (biokompatybilność), doskonałe właściwości nawilżające oraz naturalne działanie przeciwdrobnoustrojowe. Cechy te, w połączeniu z bogatą charakterystyką profilu lipidowego tłuszczu owadziego, w którym wykazano wysoką zawartość cennych kwasów tłuszczowych: laurynowego, mirystynowego, palmitynowego oraz oleinowego, uzasadniają i otwierają nowe perspektywy komercyjnego wykorzystania biomasy BSF w nowoczesnym przemyśle kosmetycznym oraz w produkcji zaawansowanych środków higieny osobistej. Równie

nowatorskim i niezwykle obiecującym elementem rozprawy jest podjęty przez Autorkę temat syntezy bioplastików z komponentów białkowych *Hermetia illucens*. Kierunek ten doskonale wpisuje się w globalne trendy poszukiwania biodegradowalnych alternatyw dla ropopochodnych tworzyw sztucznych w myśl założeń gospodarki o obiegu zamkniętym. Doceniając innowacyjność tego zagadnienia, pragnę sformułować **trzecie pytanie** do Autorki: *„Które konkretne frakcje białkowe obecne w biomasie larw (np. rozpuszczalne albuminy czy strukturalne białka fibrylarne) oraz które aminokwasy posiadają optymalne predyspozycje do tworzenia stabilnych, usieciowanych matryc polimerowych o pożądanym właściwościach mechanicznych, a także w jaki sposób obecność plastyfikatorów (takich jak glicerol) modyfikuje strukturę i elastyczność takiego bio-tworzywa?”* Odpowiedź na to pytanie pozwoli zweryfikować technologiczną „dojrzałość” proponowanego rozwiązania.

W dalszej części Rozdziału 5 (5.2) Doktorantka koncentruje się na prezentacji i omówieniu wyników własnych prac eksperymentalnych nad frassem czarnej muchy, uzyskanym z biokonwersji odpadów roślin strączkowych. Autorka w interesujący sposób porównuje odpady nasion fasoli i grochu pod kątem zawartości azotu (N) oraz potencjalnych właściwości frassu jako nawozu organicznego bogatego w ten pierwiastek. Dokonuje również cennej oceny, czy tlenowe dojrzewanie (kompostowanie) frassu wpływa korzystnie na jego właściwości jako bionawozu. Niestety, odbiór tej niezwykle wartościowej poznawczo części pracy jest nieco utrudniony przez drobne błędy edytorskie. Autorka cytuje w tekście tabele w zaburzonej kolejności (przykładowo przywołując tabelę 5, następnie 8, 6, 5, 6, 7 i ponownie 6, 6, a następnie 8), co trochę utrudnia płynność śledzenia toku wywodu naukowego.

Najważniejszym wnioskiem z przeprowadzonych analiz na etapie biokonwersji jest fakt, że larwy hodowane na odpadach z grochu wykazywały wyższą przeżywalność i lepszą dynamikę przepoczwarczenia w wariantach, w których odnotowano niższą zawartość toksycznych dla nich jonów amonowych. Sam proces biokonwersji tych bogatych w białko substratów prowadził ostatecznie do powstania frassu o odczynie alkalicznym. Odnosząc się do tego zjawiska, Autorka formułuje w tekście następujące stwierdzenie: „zmiana ta mogła być spowodowana poprzez rozkład i transformację kwasów organicznych oraz tworzenia jonów NH_4^+ co uwidoczniło na Rys. 6, a także z wytwarzania zasad organicznych w procesie rozkładu białek”. Z punktu widzenia chemii i biochemii rolniczej, zapis ten wykazuje pewną niespójność logiczną i pojęciową. Sam proces rozkładu kwasów organicznych (zmniejszający pulę wolnych jonów H^+ oraz uwalnianie amoniaku NH_3 w procesie deaminacji białek faktycznie alkalizuje środowisko, wywołując skok pH. Jednakże fizjologiczny zapis tego zjawiska powinien precyzować, że to właśnie wiązanie wolnych protonów wodoru przez gazowy amoniak podnosi pH podłoża, w wyniku czego powstaje wspomniany kation amonowy NH_4^+ . Sformułowanie to wymagałoby zatem przerehabilitacji w celu nadania mu pełnej poprawności naukowej, zwłaszcza że w kontekście agrochemicznym to właśnie formy mineralne – amonowa NH_4^+ oraz azotanowa NO_3^- – decydują o ostatecznej wartości nawozowej frassu, będąc jedynymi postaciami azotu przyswajanymi przez rośliny.

W związku z tym, jako **czwarte pytanie** na obronę rozprawy, zwracam się do Autorki: *„Jak na podstawie analizy stężeń jonów NH_4^+ oraz NO_3^- w suchej masie surowych substratów, świeżych frassów po biokonwersji przez larwy oraz dojrzałych bionawozach ocenia Pani potencjalną wartość i stabilność azotu w gotowym produkcie nawozowym z odpadów fasoli i grochu? Z czego wynika fakt, że świeży frass z grochu, mimo niższej zawartości N całkowitego – charakteryzował się wyższą pulą bezpośrednio dostępną dla roślin form mineralnych NH_4^+ oraz azotanowej NO_3^- w suchej masie po biokonwersji przez larwy, i czy zjawisko tak intensywnej mineralizacji na wczesnym etapie nie wiąże się z ryzykiem strat gazowych azotu w procesie dalszego, tlenowego dojrzewania?”*

W kontekście powyższych rozważań Autorka przechodzi do analizy wartości stosunku węgla do azotu (C/N), zaprezentowanych w Tabeli 8, prawidłowo odnosząc się już do suchego frassu dojrzewającego w warunkach tlenowych. W swojej interpretacji tłumaczy, że odnotowany wysoki indeks C/N w dojrzałym frassie z grochu wynika z relacji matematycznej (strona 53). Dalej słusznie wskazuje, że w zależności od tej proporcji, azot po wprowadzeniu do gleby może ulegać mineralizacji do postaci jonów łatwo przyswajalnych dla roślin (przy niskich wartościach ok. 20-30) bądź unieruchomieniu (immobilizacji) przez mikroorganizmy glebowe (przy wysokich parametrach). Obliczeniowo, wniosek jest poprawny. Jednak z punktu widzenia dynamiki przemiany materii organicznej oraz powiązanej z nią analizy statystycznej, uzyskany wynik okazuje się frapujący. Fakt, że zawartość węgla całkowitego wykazała istotne różnice statystyczne i uległa obniżeniu w dojrzałym frassie w porównaniu do fazy świeżej, świadczy o standardowym przebiegu procesów dekompozycji i strat węgla w postaci CO₂ podczas tlenowego dojrzewania. Uzyskane wyniki dowodzą, że intensywne utrata azotu (w formie gazowego NH₃) zachodziła głównie w fazie świeżego frassu. Skoro mimo równoległego spadku stężenia węgla w fazie dojrzałej ostateczny stosunek C/N wariantu z grochu i tak uległ podwyższeniu, potwierdza to głęboki, wyjściowy ubytek azotu na wczesnych etapach biokonwersji. To cenne spostrzeżenie badawcze, które doskonale uzupełnia wcześniejsze wnioski o niestabilności azotu tego wariantu. Mając to na uwadze, formułuję kolejne, **piąte pytanie** do Autorki: *„Jak, w świetle wykazanych istotnych statystycznie różnic w stężeniu węgla całkowitego pomiędzy świeżym a dojrzałym frassem z grochu, interpretuje Pani dynamikę mikrobiologicznego rozkładu frakcji węglowej w fazie tlenowej? Skoro końcowy, wysoki stosunek C/N w dojrzałym bionawozie ukształtował się pod wpływem ubytku w fazie dojrzałej przy jednoczesnym braku zmian azotu całkowitego na tym etapie, co jest konsekwencją jego wcześniejszego, drastycznego ubytku w fazie świeżej – jakie niesie to za sobą konsekwencje dla ostatecznej jakości agrochemicznej nawozu w kontekście ryzyka przejściowej immobilizacji azotu przez mikroorganizmy po wprowadzeniu go do gleby?”*

W podsumowaniu omawianego fragmentu Doktorantka słusznie konkluduje, że proces biokonwersji substratów strączkowych przez larwy *Hermetia illucens* doprowadził to istotnych zmian stężeń makroskładników w świeżych frassach. Prawidłowo identyfikuje tu mechanizm tzw. „zateżenia” (koncentracji) pierwiastków, który wynika bezpośrednio z ubytku suchej masy podłoża na skutek żerowania larw oraz tlenowej mineralizacji mikrobiologicznej. Bardzo cennym i praktycznym elementem pracy jest precyzyjne wyznaczenie stosunku N:P:K, który dla świeżego frassu z fasoli wynosił 4,7:1,8:2,3, natomiast dla grochu kształtował się na poziomie 1,5:1,7:1,1. Przedstawione wartości jednoznacznie potwierdzają wysoki potencjał aplikacyjny obu badanych frassów jako nawozów organicznych. Warto jednak zauważyć, że drastycznie niższy udział N w profilu odżywczym uzyskanym z frassu z grochu (1,5) stanowi kolejne, silne poparcie zarysowanej wcześniej hipotezy o intensywnych stratach gazowych tego pierwiastka już na wstępnym etapie biokonwersji. Te wysoce interesujące i doskonale udokumentowane powiązania agrochemiczne stanowią niewątpliwą wartość aplikacyjną recenzowanej rozprawy.

Na uznanie zasługuje również trafna interpretacja przemian azotu mineralnego, jakiej Autorka dokonuje w kontekście procesu dojrzewania materiału. Doktorantka słusznie konkluduje, że spadek stężenia kationów amonowych NH₄⁺ nie nastąpił w wyniku ich biologicznego utleniania do azotanów NO₃⁻, ponieważ poziom tych ostatnich pozostał na stabilnym poziomie. W warunkach wykazanego wcześniej zasadowego pH frassu z grochu odnotowany ubytek formy amonowej jest bezpośrednim dowodem na intensywną, fizyczną ewaporację (ulatnianie się) wolnego amoniaku NH₃ do atmosfery. Taka interpretacja doskonale uzupełnia wcześniejszy wywód o stratach tego biogenu i potwierdza wysoką dojrzałość badawczą Autorki.

W tej części rozprawy Doktorantka przedstawia jeszcze proporcje N:P:K dla bionawozów dojrzałych, które dla frakcji z fasoli wynosiły 1,5:2,2:3, natomiast dla próby z grochu kształtowały się na poziomie 1:2,8:3,1. Autorka słusznie i z dużą wyobraźnią agronomiczną konstatuje, że tak sformułowane parametry, charakteryzujące się niskim udziałem N przy jednoczesnej wysokiej koncentracji P i K, predestynują dojrzałe frassy do wykorzystania w nawożeniu jesiennym. Z punktu widzenia agrotechniki jest to wniosek w pełni uzasadniony; nawozy jesienne nie powinny pobudzać roślin do wzrostu przed zimą (stąd minimalna ilość N), lecz budować ich mrozoodporność i stymulować rozwój systemu korzeniowego (co zapewniają P i K). Ta aplikacyjna puenta stanowi udane i praktyczne zamknięcie prezentowanych badań agrochemicznych tej części pracy.

W Rozdziale 5.3 Doktorantka podejmuje kolejny, niezwykle ważny z punktu widzenia bezpieczeństwa środowiskowego temat, oceniając zmiany ilościowe oraz jakościowe profilu mykotoksyn w świeżym i dojrzałym frassie. Autorka słusznie stawia hipotezę, że proces biokonwersji substratów odpadowych przez larwy *Hermetia illucens* prowadzi do redukcji występowania tych toksycznych metabolitów wtórnych grzybów. Praca imponuje pod względem analitycznym – oznaczono aż 25 różnych związków (Tabela 11), co dowodzi ogromnego rygoru badawczego. Jako materiał wyjściowy posłużyły nasiona fasoli naturalnie zanieczyszczone pleśnią, w której zidentyfikowano 6 rodzajów grzybów (w tym kluczowe fitopatogeny z rodzajów *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* oraz *Aspergillus*). Zgromadzone wyniki eksperymentalne w pełni potwierdziły założenia: biokonwersja substratu przez owady skutkowałą wyraźnym obniżeniem ogólnej zawartości mykotoksyn. Co szczególnie istotne w kontekście sanitarnym, w żadnej z badanych próbek poreakcyjnych nie stwierdzono obecności deoksyniwalenolu, monoacetoksyscirpenolu, diacetoksyscirpenolu oraz toksyny T-2. Taki stan rzeczy stanowi bardzo silny i pożądany argument na korzyść aplikacyjnego wykorzystania frassów jako bezpiecznych bionawozów organicznych, wolnych od kluczowych agro-toksyn. Niezwykle interesującym zjawiskiem, odnotowanym przez Doktorantkę, było jednak pojawienie się po procesie biokonwersji nowych mykotoksyn, będących metabolitami zearalenonu: form alpha- oraz beta- zearalenolu, przy czym wyższe ich stężenia w obu przypadkach oznaczono w świeżym frassie. Autorka słusznie podejmuje próbę interpretacji tego fenomenu, wysuwając dywagację, że związki te mogą potencjalnie hamować wzrost pożytecznych bakterii glebowych z rodzaju *Bacillus*. Choć hipoteza ta jest mikrobiologicznie uzasadniona, to w sferze dyskusji naukowej warto byłoby poszerzyć ją o aspekty z zakresu fizjologii roślin. Jak bowiem wykazują fundamentalne badania (m.in. przywoływane w literaturze przez zespół Kościelniak et al.), zearalenon oraz jego pochodne w niskich stężeniach mogą działać w świecie flory jako specyficzne regulatory wzrostu o charakterze hormonalnym. Związki te wykazują udowodnioną zdolność do stymulacji rozwoju generatywnego (np. indukcji kwitnienia) czy aktywacji aparatów szparkowych. Wprowadzenie tej perspektywy rzuca zupełnie nowe, niezwykle obiecujące światło na uzyskane wyniki. Obecność alpha- oraz beta- zearalenolu we frassie – zwłaszcza w fazie świeżej – nie musi być rozpatrywana wyłącznie jako zanieczyszczenie czy czynnik hamujący mikroflorę, ale może stanowić o dodatkowych, biostymulacyjnych właściwościach nawozu, który aplikowany dogłębnie może bezpośrednio stymulować rozwój i plonowanie roślin uprawnych. Spostrzeżenie to znacząco podnosi potencjał aplikacyjny doktoratu i otwiera bardzo ciekawy wątek do przyszłych publikacji naukowych Autorki.

Niezaprzeczalnie najciekawszym z perspektywy fizjologa roślin elementem rozprawy jest Rozdział 5.4, w którym Doktorantka w sposób niezwykle nowatorski łączy ideę recyklingu odpadów z założeniami zrównoważonego rolnictwa. Przedmiotem wnikliwych analiz stał się tutaj frass owadzi oraz, co zasługuje na szczególne wyróżnienie, odciek powstały bezpośrednio w trakcie procesu hodowli larw *Hermetia illucens*, badane pod kątem zawartości

fitohormonów. Autorka wykazuje się tutaj doskonałą intuicją naukową; wykazanie obecności endogennych auksyn i cytokinin w produktach poreakcyjnych pozwala bowiem wysunąć w pełni uprawnioną tezę, że uzyskany bionawóz może działać jako silny biostymulator wzrostu i rozwoju roślin, zdolny dodatkowo do łagodzenia skutków stresów abiotycznych i biotycznych w uprawach.

W sferze teoretycznej Autorka dokonuje klasyfikacji fitohormonów na auksyny, cytokiny oraz hormony stresowe. Warto w tym miejscu jedynie uzupełniająco zasygnalizować, że ten podział ma charakter dość umowny, jako że same auksyny również odgrywają fundamentalną i udokumentowaną rolę w molekularnych oraz fizjologicznych reakcjach roślin na czynniki stresowe. Doktorantka słusznie koncentruje się na analizie głównych, wolnych form tych regulatorów, przyjmując kwas indolilo-3-octowy (IAA) jako reprezentatywny marker dla grupy auksyn. Stężenia tych związków zostały precyzyjnie oznaczone i podane w nanogramach na miligram (ng/mg) suchej masy. Analizując odpady z grochu i fasoli jako pierwotne źródła fitohormonów (Tabela 14), Doktorantka uzyskała bardzo ciekawe wyniki. We frassie powstałym z biokonwersji fasoli odnotowano ponad 306-krotny wzrost stężenia IAA w porównaniu z surowym substratem. Równie ciekawy jest wynik, że różnica w zawartości tej auksyny pomiędzy frassami pochodzącymi z dwóch różnych wariantów odpadowych wynosiła aż pięć rzędów wielkości, co jasno dowodzi, jak kluczowe znaczenie dla profilu hormonalnego nawozu ma rodzaj deponowanego komponentu organicznego.

Interesująco prezentuje się także profil cytokinin z jako reprezentatywną Zeatyną (jedną z najsilniejszych naturalnych cytokinin), która wpływa na dojrzewanie chloroplastów, co bezpośrednio przekłada się na wyższy indeks chlorofilu i wydajność fotosyntetyczną rośliny. Po procesie biokonwersji fasoli odnotowano spadek zawartości form cis-zeatyny w stosunku do substratu, przy jednoczesnym wyraźnym, 6–10-krotnym wzroście stężenia formy trans-zeatyny (trans-ZEA) w odcieku z tego wariantu. Równolegle wartości dla izopentenyladeniny (iP) wzrosły we wszystkich produktach poowadzech z fasoli, osiągając we frassie aż 165-krotny skok stężenia. Nieco inną dynamiką charakteryzował się wariant z grochu: tutaj również po biokonwersji nastąpił spadek form cis-ZEA, jednak pozostałe pochodne osiągały najwyższe stężenia w odciekach, gdzie odnotowano imponujący, ponad 108-krotny wzrost. Zbiorcze zestawienie danych wykazało, że całkowita zawartość cytokinin we frassie z fasoli była ponad 35-krotnie wyższa niż w produkcie z grochu, a w przypadku odcieków stosunek ten był 2-krotnie wyższy dla fasoli, która charakteryzowała się unikalną dominacją frakcji iP we frassie.

Doktorantka w swojej dyskusji wyciąga wnioski na podstawie całkowitej zawartości IAA oraz sumarycznej puli zmierzonych biologicznie aktywnych form cytokinin. W sferze życziwej refleksji naukowej na przyszłość warto jednak pamiętać, że z punktu widzenia czystej fizjologii roślin to nie ogólna suma, lecz konkretne, wolne i aktywne metabolicznie formy pełnią najważniejszą rolę regulacyjną w procesach wzrostowych. W przypadku cytokinin to właśnie formy bezpośrednio aktywne stymulują cytokinezę (podziały komórkowe) i opóźniają starzenie (senescencję) tkanek. Z tego względu wykazany przez Autorkę silny wzrost stężenia aktywnej trans-zeatyny w odciekach oraz iP we frassie z fasoli ma znacznie większą wagę biostymulacyjną, niż wynikałoby to z samej analizy sumarycznej. Ta subtelna uwaga interpretacyjna nie umniejsza jednak w żaden sposób wybitnie nowatorskiego charakteru tej części rozprawy. Przedstawione w Rozdziale 5.4 wyniki w pełni legitymizują aplikacyjny sukces pracy i stanowią jej najjaśniejszy, wysoce oryginalny punkt.

W ostatniej części podrozdziału 5.4 Autorka kieruje uwagę na analizę hormonów stresowych: kwasu abscysynowego (ABA), kwasu jasmonowego (JA) oraz kwasu salicylowego (SA). Doktorantka odnotowała wzrost ich stężeń we wszystkich wariantach frassu (z wyjątkiem SA dla odpadów z grochu) oraz w odciekach (Tabela 15), wskazując, że ich zawartość malała

w sekwencji SA > JA > ABA. Z perspektywy fizjologii roślin, warto w tym miejscu podjąć krótką dyskusję nad zaproponowaną interpretacją oraz sumarycznym ujęciem tych związków. Wydaje się, że podnoszenie do rangi głównego parametru „całkowitej sumy” hormonów stresowych jest pewnym uproszczeniem. Każdy z tych fitohormonów (ABA, JA, SA) inicjuje i kontroluje odmienne ścieżki sygnałowe, działając często na zasadzie wzajemnego antagonizmu (np. klasyczna relacja między obroną przed nekrotrofami regulowaną przez JA a odpowiedzią na biotrofy zależną od SA). Z tego względu sumowanie ich stężeń nie niesie ze sobą jednoznacznej wartości informacyjnej dla fizjologa i w przyszłości warto byłoby rozpatrywać te profile w inny sposób. Pewnej ostrożności wymagałyby również dywagacje na temat mechanizmów powstawania tych związków w analizowanym podłożu. Autorka wiąże syntezę ABA z regulacją enzymów z rodziny cytochromu P450 zarówno u roślin, jak i u larw *Hermetia illucens*, sugerując, że owadzie enzymy P450 mogły przyczynić się do wzrostu stężenia tego fitohormonu. W świecie zwierząt cytochromy P450 pełnią jednak specyficzne funkcje w detoksykacji ksenobiotyków oraz metabolizmie hormonów sterydowych owadów, natomiast u roślin rodzina CYP707A odpowiada za katabolizm (degradację i utlenianie) ABA, a nie za jego bezpośrednią syntezę.

Podobne, zbyt liniowe powiązania dotyczą SA i JA, których wysokie stężenia Autorka tłumaczy, odpowiednio, głównie obecnością fenyloalaniny w nasionach fasoli oraz pierwotnym występowaniem JA w materiale wyjściowym. Warto wziąć pod uwagę, że frass jest środowiskiem żywym, podlegającym intensywnej sukcesji mikrobiologicznej. Dynamiczny rozwój specyficznej mikroflory (bakterii i grzybów) w trakcie dekompozycji oraz w jelitach samych larw wiąże się z produkcją licznych mikrobiologicznych metabolitów wtórnych. Ponieważ wiele mikroorganizmów posiada autonomiczne zdolności do syntezy fitohormonów, w tym ABA, JA czy SA, to właśnie aktywność mikrobiomu stanowi najbardziej prawdopodobne źródło nagromadzenia tych substancji, a nie matryca metaboliczna samych larw czy prosta dostępność aminokwasów w nasionach. Wskazanie na ten mikrobiologiczny aspekt w toku publicznej obrony pozwoliłoby na jeszcze pełniejsze i bezpieczniejsze metodologicznie sformułowanie wniosków fizjologicznych.

W Rozdziale 6 *Podsumowanie i wnioski* Doktorantka słusznie uznaje, że odpady po hodowli *Hermetia illucens* wykazują ogromny potencjał do stosowania jako pełnowartościowy bionawóz organiczny. Autorka trafnie podkreśla, że uzyskany produkt jest bogaty w dobrze przyswajalne, mineralne formy azotu, co stanowi o jego wysokiej wartości odżywczej dla roślin. Jednocześnie, wykazując się dużą dojrzałością metodologiczną, Doktorantka słusznie wskazuje na konieczność tlenowego dojrzenia (kompostowania) frassu w sytuacji odnotowania wysokich stężeń kationów amonowych, co pozwala zapobiegać zjawisku fitotoksyczności. Na szczególną uwagę zasługuje również wniosek aplikacyjny dotyczący możliwości wykorzystania samych larw do entomoremediacji substratów naturalnie zanieczyszczonych pleśniami, co poparte zostało redukcją oznaczanych mykotoksyn w produkcie poreakcyjnym. Ostatnim, niezwykle innowacyjnym wnioskiem jest wskazanie na celowość szerokiego wykorzystania zarówno stałej frakcji frassu, jak i odcieków hodowlanych w charakterze biostymulatorów. Obecność zidentyfikowanych fitohormonów (auksyn i cytokinin) pozwala w przyszłości na realne projektowanie nowoczesnych preparatów wspomagających wzrost, rozwój oraz naturalną odporność roślin na stresy środowiskowe. Sformułowane w ten sposób wnioski końcowe są w pełni spójne z zaprezentowanym materiałem eksperymentalnym, mają wybitnie aplikacyjny charakter i stanowią silny punkt obroniony w recenzowanej dysertacji.

Podsumowanie i wniosek końcowy.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska stanowi oryginalne, wysoce innowacyjne i interdyscyplinarne studium naukowe, wnoszące istotny wkład w rozwój dyscypliny

stanowiącej przedmiot badań, w obszarach tematycznych leżących na styku entomologii stosowanej, agrochemii, mikrobiologii gleby oraz fizjologii żywienia i fizjologii roślin. Doktorantka wykazała się doskonałym warsztatem badawczym, rygiorem analitycznym oraz dużą dojrzałością w wyciąganiu wniosków o charakterze aplikacyjnym. Zaprezentowane badania nad biokonwersją odpadów przez larwy *Hermetia illucens*, entomoremediacją mykotoksyn oraz potencjałem nawozowym i biostymulacyjnym frassu oraz odcieków hodowlanych posiadają niezaprzeczalną wartość użytkową w kontekście gospodarki o obiegu zamkniętym i zrównoważonego rolnictwa. Dostrzeżone w tekście drobne niedopatrzenia edytorskie czy pewne skróty myślowe w interpretacji biochemicznej mają charakter wyłącznie dyskusyjny i w żaden sposób nie obniżają wysokiej oceny merytorycznej całego dzieła. Konkludując, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska w pełni spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim określone w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym. W związku z powyższym z pełnym przekonaniem wnioskuję do Wysokiej Rady o dopuszczenie Doktorantki do kolejnych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora oraz do publicznej obrony. Biorąc pod uwagę wybitną wartość naukową, aplikacyjną oraz wykraczający poza standardowe wymogi dorobek publikacyjny Kandydatki, z pełnym przekonaniem **wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej o wyróżnienie przedłożonej rozprawy doktorskiej.**

Ja, niżej podpisana, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska **mgr Moniki Patrycji Kaczor** 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.) i wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki *im. Bohdana Dobrzańskiego* Polskiej Akademii Nauk w Lublinie o dopuszczenie **mgr Moniki Patrycji Kaczor** do dalszych etapów postępowania doktorskiego oraz o jej wyróżnienie.



.....14.06.2026.....

data sporządzenia recenzji

podpis recenzenta