



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Poznań, 08.08.2023r.

dr hab. inż. Agnieszka Wolna-Maruwka, prof. UPP
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Rolnictwa Ogrodnictwa i Bioinżynierii
Katedra Gleboznawstwa i Mikrobiologii
ul. Szydlowska 50
60-656 Poznań

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej

Mgr inż. Michała Tomasza Możejki

pt. „Badania nad ekologicznymi uwarunkowaniami występowania szczepów keratynolitycznego grzyba *Trichophyton ajelloi* w glebach uprawnych i ich uzdolnieniami do przetwarzania odpadowej keratyny pierza na preparaty nawożeniowe”

1. Podstawa opracowania recenzji

Rozprawa doktorska mgr inż. Michała Tomasza Możejki wykonana została w Katedrze Mikrobiologii Środowiskowej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie pod kierunkiem promotora dr hab. Justyny Bohacz, prof. Uczelni. Recenzję wykonano w związku z uchwałą Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 31 maja 2023 roku, dotyczącą wyznaczenia recenzenta rozprawy doktorskiej mgr inż. Michała Możejki, podpisanej przez Przewodniczącą Rady Dyscypliny prof. dr hab. Barbarę Kołodziej oraz umowy na wykonanie recenzji z dnia 15 czerwca 2023 roku, podpisanej przez Prorektora ds. Kadr prof. dr hab. Andrzeja Marczuka.

2. Ogólna charakterystyka – zasadność podjęcia tematu

Obserwowany w ostatnich latach wzrost spożycia mięsa drobiowego sprawia, że Polska zajmuje jedno z czołowych miejsc w jego produkcji w Europie. Z danych statystycznych wynika, że w ciągu ostatnich sześciu lat odnotowano 6% wzrost konsumpcji mięsa drobiowego na świecie oraz 32% w Polsce. Intensyfikacja produkcji drobiarskiej z jednej strony

zapewnia wyższą opłacalność, a z drugiej strony wiąże się z większą ilością produktów odpadowych o wysokim potencjale recyklingu, takich jak pióra.

Według obowiązujących regulacji prawnych z zakresu gospodarki odpadami pierze zaliczane jest do 3 kategorii odpadów, o niskim stopniu zagrożenia dla zdrowia ludzi i zwierząt. Natomiast wysoka zawartość azotu (12–18%) i siarki organicznej (2–5%) w ich składzie sprawia, że po odpowiednim przetworzeniu mogą być wykorzystane na cele rolnicze. Niestety pomimo postępującego rozwoju gospodarki odpadami pochodzenia zwierzęcego, metody aplikacji i badania skuteczności nawozów powstałych w wyniku mikrobiologicznej biodegradacji odpadów z pierza kurczego pozostają w praktyce słabo rozwinięte.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Michała Możejki koncentruje się m.in. na badaniach dotyczących nawozowego wpływu hydrolizatów keratynowych uzyskanych po rozkładzie pierza kurcząt przez szczepy *Trichophyton ajelloi*.

Na podstawie przeprowadzonych badań udowodniono, że hydrolizat keratyny otrzymany w zoptymalizowanych warunkach hodowli grzyba *Trichophyton ajelloi*, ze względu na wysoką zawartość rozpuszczalnych białek, peptydów i aminokwasów, a także jonów amonowych i siarczanowych można uznać za bionawóz mineralno-organiczny, zwłaszcza w uprawie roślin o dużych wymaganiach siarkowych, takich jak rzepak. Jak wynika z przeglądu literatury oraz zaprezentowanych w recenzowanej dysertacji wyników badań, hydrolizaty uzyskane w procesie mikrobiologicznego rozkładu keratyny pierza są alternatywną, wobec chemicznych środków nawożeniowych, a zarazem przyjazną dla środowiska i bezpieczną dla zdrowia konsumentów formą nawozów. Jest to nie tylko innowacyjne rozwiązanie z zakresu ochrony środowiska, ale również rolnictwa, w którym obecnie ze względu na obostrzenia wynikające z regulacji Europejskiej Strategii Bioróżnorodności (2020) coraz częściej podejmowane są próby stosowania nawozów wytworzonych na drodze przetwarzania mikrobiologicznego.

Badania podjęte przez Doktoranta są niezwykle istotne i w pełni uzasadnione. Wpisują się bowiem w zasady gospodarki odpadami w obiegu zamkniętym oraz zrównoważonego rolnictwa, pozwalając jednocześnie na lepsze poznanie ekologicznych uwarunkowań wzrostu grzybów keratynofilnych w glebach różniących się właściwościami fizykochemicznymi oraz określenie optymalnych parametrów warunków ich hodowli, w celu przyspieszenia procesu keratynolizy odpadów pierza kurcząt.

3. Formalna ocena rozprawy

Rozprawa doktorska została przygotowana w formie manuskryptu, składającego się ze spójnego tematycznie zbioru artykułów, opublikowanych w czasopismach naukowych.

Zaprezentowane w niej badania sfinansowano z dwóch zadań badawczy nr RKM/DS4/ (lata 2005 - 2018) pt. „Badania nad ekologią i uzdolnieniami biochemicznymi grzybów glebowych/Badania nad ekologią i uzdolnieniami biochemicznymi saprotroficznych drobnoustrojów” oraz zadania nr RKM/S/21/ (lata 2019 - 2022) pt. „Badania nad ekologią mikrogrzybów i wykorzystaniem wyselekcjonowanych szczepów grzybów do biodegradacji poprodukcyjnego pierza na cele praktyczne”, w których Doktorant był wykonawcą. Były one finansowane ze środków MNiSW/MEiN na utrzymanie potencjału badawczego UP w Lublinie. Dodatkowo badania realizowano w ramach projektu badawczego pt. „Badanie fitotoksyczności płynów pochodzących otrzymanych po grzybowej biodegradacji pierza oraz ich wpływu na biologiczną aktywność gleby oraz wzrost roślin” nr RKM/MN-2/RIO/22, finansowanego ze środków na naukę, przyznanych przez MEiN, na okres od 1.05.2022 r. do 31.01.2023 r., w którym mgr Michał Możejko był kierownikiem i głównym wykonawcą.

W skład manuskryptu wchodzi trzy oryginalne publikacje naukowe, jedna przeglądowna oraz jeden nieopublikowany artykuł naukowy, o łącznym sumarycznym *Impact Factor* wynoszącym 11,971 oraz liczbie punktów wg wykazu MEiN równej 360 (zgodnie z rokiem wydania). Zbiór ten stanowi zwięzłe omówienie podjętego w ramach rozprawy doktorskiej problemu badawczego, zawartego w publikacjach naukowych opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, takich jak: *Agriculture*, *Agronomy* czy *International Journal of Environmental Research and Public Health* i stanowi go pięć poniższych prac:

P1. Możejko, M., Bohacz, J., 2021. Mikroorganizmy i enzymy keratynolityczne. W: Wybrane zagadnienia z zakresu rolnictwa. Babicz, M., Nowakowicz-Dębek, B. (red.). Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, s. 96-103. ISBN: 978-83-7259-344-3. (MEiN2019-2021 20 pkt., IF_{JCR} 0,000)

P2. Bohacz, J., Możejko, M., Kornilowicz-Kowalska, T., Siebielec, G., 2022. Impact of ecological factors on the occurrence and spatial-taxonomic structure of keratinophilic fungi and their co-occurrence in arable soils. *Agriculture* 12, 194. (MEiN2019-2021 100 pkt., IF_{JCR} 3,408)

P3. Bohacz, J., Możejko, M. Biodegradation of feather keratin by pigmented and non-pigmented fungal strains of *Trichophyton ajelloi* from two soils with different physical and chemical properties (nieopublikowany artykuł naukowy, wysłany do czasopisma)

P4. Możejko, M., Bohacz, J., 2022. Optimization of conditions for feather waste biodegradation by geophilic *Trichophyton ajelloi* fungal strains towards further agricultural use. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19, 10858. (MEiN2019-2021 140 pkt., IF_{JCR} 4,614)

P5. Możejko, M., Bohacz, J., 2023. Effect of keratin hydrolysates obtained from feather

decomposition by *Trichophyton ajelloi* on plant germination, growth and biological activity of selected arable soils under model conditions. *Agronomy* 13, 187. (MEiN2019-2021 100 pkt., IF_{JCR} 3,949

Doktorant jest pierwszym autorem w trzech publikacjach naukowych, w jednej z nich również autorem korespondencyjnym (poz. P3). Ponadto w dwóch pozostałych opracowaniach naukowych jest autorem korespondencyjnym.

Z załączonych oświadczeń dotyczących współautorstwa wynika, że Jego indywidualny wkład w powstanie prac był bardzo znaczący, wynoszący odpowiednio od 45% do 90%. W trakcie opracowywania publikacji brał udział w tworzeniu koncepcji, wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu wyników badań i zgromadzeniu materiału literaturowego, wykonaniu rysunków, tabel i statystycznym opracowaniu wyników badań, jak również napisaniu manuskryptów oraz ustosunkowaniu się do uwag recenzentów.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej objęto prawidłowo sformułowanym tytułem „Badania nad ekologicznymi uwarunkowaniami występowania szczepów keratynolitycznego grzyba *Trichophyton ajelloi* w glebach uprawnych i ich uzdolnieniami do przetwarzania odpadowej keratyny pierza na preparaty nawożeniowe” i przedstawiono w postaci 299 - stronicowego opracowania, obejmującego 8 rozdziałów, zaprezentowanych w następującej kolejności: Wprowadzenie, Hipotezy i cele badań, Materiał i metody oraz Omówienie wyników i dyskusja. Kolejne rozdziały stanowią Ważniejsze wyniki i wnioski, Bibliografia, następnie załączono kopie prac wchodzących w skład osiągnięcia oraz oświadczenia dotyczące wkładu w przygotowanie opublikowanych prac naukowych.

Ponadto na początku opracowania zamieszczono oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej, dotyczące spełniania warunków dysertacji do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego, streszczenie w języku polskim i angielskim. Natomiast na jego końcu załączono wykaz dorobku Doktoranta niebędącego przedmiotem rozprawy doktorskiej. W skład którego wchodzi 3 publikacje naukowe ujęte w wykazie MEiN, o łącznym sumarycznym *Impact Factor* wynoszącym 13,43, jak również 3 rozdziały w monografiach, 1 praca popularnonaukowa, 1 zgłoszenie patentowe, przygotowanie i udział w 3 projektach badawczych, z których 2 otrzymało finansowanie i dodatkowo uczestnictwo w licznych konferencjach zarówno o zasięgu krajowym, jak i międzynarodowym.

Stwierdzam, że układ przedłożonej do recenzji rozprawy nie budzi zastrzeżeń pod względem formalnym. Przygotowana została bardzo starannie, charakteryzuje ją czytelna struktura i atrakcyjna szata graficzna. Za bardzo przydatne w studiowaniu dysertacji uważam umieszczenie na 23 stronie rozdziału „Materiał i metody” schematu przedstawiającego

kolejność zadań badawczych realizowanych w poszczególne publikacjach, służących rozwiązaniu podjętej problematyki badawczej oraz weryfikacji postawionych założeń.

4. Merytoryczna ocena pracy

W przedłożonym osiągnięciu naukowym Autor porusza niezwykle istotną z punktu widzenia rolnictwa i ochrony środowiska tematykę dotyczącą wtórnego zagospodarowania odpadów keratynowych, które powinno być ukierunkowane na zamknięcie w cyklu stałym materii i energii. Racjonalny recykling odpadów organicznych ważny jest między innymi z powodu wyczerpania dostępnych zasobów składników mineralnych w glebach, do czego dochodzi w skutek sukcesywnego wzrostu zapotrzebowania na żywność.

W pierwszym rozdziale opracowania, który stanowi 7 – stronicowe „Wprowadzenie” Doktorant początkowo porusza tematykę dotyczącą pochodzenia materii keratynowej, a następnie odnosząc się do danych Głównego Urzędu Statystycznego przedstawia skalę występowania odpadów keratynowych, w szczególności pierza odpadowego.

Mgr Michała Możejko zwraca również uwagę na znaczenie i udział grzybów keratynolitycznych w przetwarzaniu odpadów keratynowych oraz na ograniczenia w stosowaniu technologii mikrobiologicznych do przeprowadzenia niniejszego procesu. Podkreślając, że otrzymany w wyniku grzybowej biodegradacji piór hydrolizat keratynowy rozpatrywać można jako potencjalny nawóz mineralno-organiczny do użyźniania gleby i poprawy plonowania roślin, w szczególności o wysokim zapotrzebowaniu na siarkę, sprawnie przechodzi do kolejnego podrozdziału, w którym prezentuje informacje dotyczące roli tego pierwiastka w ich metabolizmie.

Całość zamyka ostatni podrozdział dotyczący znaczenia biopreparatów o charakterze hydrolizatów białkowych w rolnictwie, w którym Doktorant podkreśla na konieczność opracowywania nowych rozwiązań dotyczących zastosowania oraz oceny efektywności działania nawozów otrzymanych w wyniku mikrobiologicznej biodegradacji i biotransformacji odpadów pierza kurcząt.

Układ treści w rozdziale uważam za bardzo logiczny, a poszczególne tematy ułożone są w prawidłowej kolejności, brakuje jedynie informacji o dostępności na rynku krajowym i światowym tego typu komercyjnych biopreparatów nawozowych. Dlatego proszę o wyjaśnienie, czy takie bioprodukty istnieją i jaka jest skuteczność ich działania?

Drugi rozdział dysertacji przedstawia jasno i precyzyjnie sformułowaną główną hipotezę badawczą, cztery szczegółowe hipotezy oraz pięć szczegółowych celów badawczych, które zmierzają do zweryfikowania, czy wstępowanie oraz skład jakościowy keratynofilnych i

nie-keratynofilnych grzybów zależy od właściwości fizykochemicznych gleby (publikacja P2). Dodatkowo, czy gatunek keratynolityczny *Trichophyton ajelloi* różni się aktywnością keratynolityczną w obrębie szczepów oraz czy ta cecha ma związek z typem gleby (publikacja P3). Ponadto jakie warunki hodowli grzyba *Trichophyton ajelloi* pozwalają na uzyskanie hydrolizatu keratynowego o wysokiej wartości nawozowej (publikacja P4) oraz jaki jest jego wpływ na plon rzepaku oraz wybrane parametry gleby (publikacja P5).

Uważam, że sposób sformułowania, a następnie walidacji założeń świadczą o dojrzałości naukowej Autora, który w sposób świadomy i przemyślany krok po kroku realizował postawione cele badawcze. W zaplanowanych badaniach przyjął schemat doświadczeń zgodny z metodologią stosowaną w naukach rolniczych. Na uznanie zasługuje bardzo złożony warsztat metodyczny Doktoranta. Począwszy od standardowych metod oznaczenia liczebności mikroorganizmów glebowych, czy izolacji kultur grzybów oraz określenia ich aktywności biochemicznej, po zastosowanie nowoczesnych technik biologii molekularnej, które umożliwiły m.in. określenie przynależności systematycznej testowanych grzybów. Uważam, że zastosowane metody badawcze dobrano prawidłowo, co pozwoliło na uzyskanie bardzo wartościowych wyników badań.

Po zapoznaniu się z tą częścią dysertacji nasuwają mi się jedynie uwagi dotyczące terminu „dehydrogenazy” (str. 32), który powinien być używany w liczbie mnogiej oraz tytułu jednego z podrozdziałów, który brzmi „Oznaczenie aktywności enzymatycznej i biochemicznej”, a przecież aktywność enzymatyczną zamiennie nazywamy biochemiczną.

W kolejnym rozdziale „Omówienie wyników i dyskusja” Autor w sposób syntetyczny opisał rezultaty badań przedstawione w poszczególnych publikacjach wchodzących w skład dysertacji, odnosząc się do osiągnięć innych badaczy. Jest to część pracy napisana w sposób zrozumiały, precyzyjne podzielona na wzajemnie uzupełniające się bloki tematyczne, co pozwoliło na uzyskanie istotnych informacji na temat:

- częstotliwości występowania oraz składu rodzajowego i gatunkowego grzybów keratynofilnych i nie-keratynofilnych zasiedlających odpadowe pierze kurcząt w glebach uprawnych różniących się właściwościami fizykochemicznymi,
- oceny poziomu aktywności keratynolitycznej najliczniej występującego w glebach uprawnych gatunku, reprezentowanego przez *Trichophyton ajelloi*, celem wytypowania najbardziej aktywnych szczepów, stosowanych w biodegradacji keratyny do hydrolizatu keratynowego, czyli bioproduktu o wysokiej wartości nawozowej,
- określenia optymalnego składu podłoża oraz warunków hodowli *Trichophyton ajelloi*, w celu przyspieszenia procesu keratynolizy odpadów pierza kurcząt,

- wpływu hydrolizatów keratynowych uzyskanych po rozkładzie pierza kurcząt przez wyselekcjonowany szczep *Trichophyton ajelloi* na kiełkowanie i przyrost biomasy rzepaku i aktywność biologiczną gleby.

Merytoryczną część opracowania kończy rozdział „Ważniejsze wyniki i wnioski”, z których wynika, że przeprowadzone badania, zaprezentowane w postaci monotematycznego cyklu publikacji potwierdziły postawione założenia. Po zgromadzeniu materiału szczepowego Doktorant udowodnił, że występowaniu grzybów keratynofilnych sprzyjają gleby o wysokiej zawartości frakcji pyłu i iłu oraz niskiej piasku.

Trichophyton ajelloi należący do grupy dermatofitów geofilnych dominował w glebie piaszczystej, gliniastej i w czarnoziemiu, a jego frekwencja zależała głównie od pH gleb, zawartości kationów magnezu i wapnia oraz fosforu przyswajalnego i była wysoka w glebach silnie kwaśnych (piaszczysta) i kwaśnych (gliniasta i czarnoziem), pozbawionych CaCO_3 .

Udowodniono również, że spośród wyizolowanych szczepów *Trichophyton ajelloi* aż 37 cechowała zdolność do biodegradacji pierza odpadowego. Ponadto poziom ich aktywności nie zależał jedynie od pochodzenia, ale również zdolności do wydzielania pigmentu. Na uwagę zasługuje również wykazanie po raz pierwszy, że pigmentujące szczepy *Trichophyton ajelloi*, zwłaszcza wyizolowane z gleby gliniastej wykazują silniejszą aktywność keratynolityczną, niż izolaty niepigmentujące. Natomiast najsilniejsze uwalnianie jonów amonowych i siarczanowych oraz ubytek masy piór w trakcie hodowli *Trichophyton ajelloi* ma miejsce między 14 a 21 dniem, w podłożu zawierającym 1% dawkę pór, o pH równym 4,5 oraz temperaturze inkubacji wynoszącej 28°C.

Bardzo ważnym osiągnięciem rozprawy doktorskiej jest również aspekt praktyczny obejmujący stymulacyjny wpływ hydrolizatów keratynowych na aktywność biologiczną gleby, zawartość sDNA w szczególności w glebie piaszczystej, solubilizację fosforu oraz prawie dwukrotny wzrost biomasy rzepaku, dający perspektywy do rozwoju nowych rozwiązań w zrównoważonym rolnictwie.

Reasumując stwierdzam, że Doktorant zaprezentował bardzo dobrą znajomość podjętej problematyki badawczej, którą sprawnie zaprezentował w postaci monotematycznego cyklu publikacji składających się na rozprawę doktorską. Dobór metod badawczych, sposób przedstawienia założeń oraz zaprezentowania wyników badań świadczy o dojrzałości naukowej Autora. Przedstawione do oceny prace wnoszą do literatury przedmiotu wiele nowych aspektów o charakterze poznawczym i aplikacyjnym. Mieszczą się w szeroko pojętej agronomii, jednocześnie nawiązując do zagadnień ochrony środowiska. Uważam, że oceniana rozprawa

doktorska prezentuje wysoką wartość naukową ze względu na kompleksowe podejście do realizowanej problematyki badawczej.

W trakcie analizy niniejszej dysertacji nasunęło mi się kilka uwag, które zamieściłam powyżej.

Dodatkowo proszę Doktoranta o ustosunkowanie się do następujących pytań:

- Dlaczego w przypadku gleby piaszczystej, na której uprawiano rzepak łączna dawka wprowadzona azotu wyniosła $171\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$, natomiast w przypadku czarnoziemiu $183\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$, skoro zgodnie z Dyrektywą azotanową zastosowana dawka nie może przekraczać 170kg azotu w czystym składniku na 1ha ?
- Jaki był wpływ rośliny, a jaki hydrolizatu keratynowego na właściwości biochemiczne gleby oraz liczebność testowanych mikroorganizmów glebowych?
- Który z zastosowanych parametrów (mikrobiologicznych, enzymatycznych, chemicznych), za wyjątkiem plonu testowanych roślin jest Pana zdaniem najbardziej adekwatny w ocenie efektywności nawozowej zastosowanego hydrolizatu keratynowego?
- Czy według Pana może istnieć zagrożenie zakwaszenia gleby wskutek długotrwałego, cyklicznego nawożenia gleby hydrolizatami keratynowymi, uzyskanymi po mikrobiologicznym rozkładzie pierza kurcząt?
- Czy przyszłościowo mogą występować jakiegokolwiek zagrożenia środowiskowe związane z zastosowaniem hydrolizatów keratynowych powstałych przy udziale szczepów *Trichophyton ajelloi*?

5. Wniosek końcowy

Podsumowując, stwierdzam że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Michała Możejki stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego i wnosi cenny wkład w rozwój nauk rolniczych. Wskazuje ponadto na rozległą wiedzę Doktoranta nie tylko z zakresu rolnictwa, ale również ochrony i kształtowania środowiska. W trakcie jej realizacji Pan mgr Michał Możejko opanował metody niezbędne do prowadzenia badań oraz posiadał dużą umiejętność w interpretacji i dyskusji wyników.

W świetle powyższej oceny recenzowana dysertacja spełnia wszystkie 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 późniejszymi zmianami), dlatego wnioskuję o jej dopuszczenie do kolejnych etapów postępowania doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną i aplikacyjną rozprawy, jej nowatorstwo oraz dorobek naukowy Doktoranta wnioskuję o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

A. Wolna-Maruwka

Poznań, dnia 8 sierpnia 2023 r.

dr hab. inż. Agnieszka Wolna-Maruwka, prof. UPP