



UNIWERSYTET ROLNICZY
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Katedra Mikrobiologii i Biomonitoringu
31-120 Kraków, al. A. Mickiewicza 21
Tel. + 48 12 662-40-96
E-mail: kmib@urk.edu.pl

Kraków, dnia 24 lipca 2023 r.

Recenzja
rozprawy doktorskiej

Autor: mgr inż. Michał Tomasz Możejko

Tytuł pracy:

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

Praca wykonana w Katedrze Mikrobiologii Środowiskowej na Wydziale Agrobioinżynierii
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie
pod kierunkiem pani dr hab. Justyny Bohacz, prof. uczelni

Recenzja została przygotowana w odpowiedzi na pismo Przewodniczącej Rady Dyscypliny
Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie,
Pani prof. dr hab. Barbary Kołodziej z dnia 12.06.2023 roku, w którym poinformowano mnie,
że uchwałą z dnia 31.05. 2023 r. zostałam powołana na recenzentkę ww. pracy.

Problematyka badawcza

Według danych Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi Polska jest największym producentem mięsa drobiowego w Unii Europejskiej, drugim eksporterem tego mięsa w UE i czwartym globalnym eksporterem na świecie. Zgodnie z szacunkami Ministerstwa, produkcja mięsa drobiowego w Polsce w 2022 r. wyniosła ponad 3 miliony ton, z czego ponad połowa produktów przeznaczona była na eksport. Już w 2018 roku około 70% unijnej produkcji mięsa drobiowego pochodziło z Polski. Resort rolnictwa w 2022 r. odnotował wzrost produkcji drobiu o 8,2 % w stosunku do roku 2021, jednocześnie szacując, że w 2023 r. wzrost ten wyniesie kolejne 1,5 %.

Przy tak dużej produkcji drobiu niebagatelnym problemem stają się odpady poubojowe, a w szczególności ich zagospodarowanie bądź utylizacja. Spożytkowanie wartościowej biomasy wydaje się znacznie korzystniejszą opcją, jednak pozostałości w postaci piór są materiałem problematycznym ze względu na swoją specyfikę. Ze wszystkich odpadów za najtrudniejsze do zagospodarowania i przetworzenia uważa się właśnie pióra, które stanowią około 10% odpadów drobiowych. W rzeczywistości, jako odpad ze stale rosnącej produkcji drobiu, każdego roku na świecie powstaje około 9 - 10 milionów ton piór, z którymi trudno zrobić coś sensownego – dlatego wszelkie badania nad ich wykorzystaniem i zagospodarowaniem są jak najbardziej celowe i na czasie, tym bardziej, że są mało podatne na biodegradację a możliwości ich przetwarzania na mączkę drobiową są obecnie coraz bardziej ograniczane.

Mając na uwadze powyższe dane przedstawiony do recenzji doktorat, przygotowany przez mgr inż. Michała Tomasza Możejko, jest pracą doskonale wpisującą się w potrzeby współczesnego rolnictwa. Opracowanie dotyczy znacznego problemu ekologicznego związanego z możliwościami zagospodarowania piór odpadowych do celów rolniczych poprzez ich wykorzystanie do produkcji biopreparatów nawozowych.

Podjęty temat badawczy z całą pewnością stanowi istotny wkład w poszerzenie wiedzy i poszukiwanie rozwiązań dotyczących kłopotliwych odpadów z szeroko pojętej branży rolniczej.

W najnowszej literaturze można znaleźć wyniki badań dotyczących zanieczyszczenia mikrobiologicznego piór, a także prace przedstawiające możliwości zagospodarowania tego odpadu poprzez kompostowanie czy pozyskiwania enzymów keratynolitycznych o zastosowaniu medycznym i farmaceutycznym, jednak prace związane z mikrobiologicznym przetwarzaniem piór w celu otrzymania bioproduktów o wysokim potencjale nawożeniowym należą do nielicznych.

W ostatnich latach wyraźnie widoczny jest wzrost zainteresowania pozyskiwaniem bezpiecznych dla środowiska oraz zdrowia ludzi i zwierząt preparatów mikrobiologicznych celem ich wdrażania do praktyki, jako środków do użyźniania gleb, nawożenia i ochrony roślin, co wskazuje na potrzebę i celowość prowadzenia takich badań – toteż podjęta w rozprawie tematyka jest aktualna i wpisuje się w bieżące potrzeby zarówno rolnictwa jak i ochrony środowiska.

Mając na uwadze różnorodność oraz szeroki zakres badań wykonanych w ramach przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej pozytywnie oceniam opracowanie, które jest nowatorskie i moim zdaniem wchodzi w zakres dziedziny nauk rolniczych i mieści się w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

Ocena pracy pod względem formalnym i strukturalnym

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, zgodnie z artykułem 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późniejszymi zmianami), stanowi zbiór 5. publikacji tematycznie związanych z 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”.

Na osiągnięcie autora, przedstawione w dysertacji, składają się następujące prace:

1. 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. (20 pkt., IF = 0,000, udział 90%),
2. 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. (100 pkt., IF = 3,408, udział 45%),
3. 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. (wysłana do czasopisma, udział 50%),
4. 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. (140 pkt., IF = 4,614, udział 55%),

5. 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. <https://doi.org/10.3390/agronomy13010187> (100 pkt., IF = 3,949, udział 60%).

Cztery artykuły są autorskimi pracami badawczymi z wiodącym udziałem Doktoranta, jedna publikacja to praca przeglądowa. Wszystkie artykuły składające się na opracowanie są publikacjami współautorskimi. Współautorką publikacji, oprócz Doktoranta, jest promotorka pracy, a jednej także inni badacze - co świadczy o jego umiejętności współpracy i pracy w zespole.

Doktorant jest pierwszym autorem w trzech pracach, a jego udział w przygotowaniu publikacji jest dominujący i określony został na poziomie od 45 do 60% w pracach badawczych oraz 90% w publikacji przeglądowej. Do dokumentacji dołączone zostały stosowne oświadczenia współautorów określające wkład i rolę mgr inż. Michała Tomasza Możejko w procesie tworzenia prac, która polegała zarówno na stworzeniu koncepcji doświadczeń, prowadzeniu badań, wykonaniu analiz i opracowaniu wyników jak i przygotowaniu manuskryptów do druku oraz pełnieniu roli autora korespondującego. Cztery artykuły wchodzące w skład pracy doktorskiej ukazały się drukiem w latach 2021-2023, trzy z publikacji składających się na osiągnięcie autora zostały wydane w czasopismach indeksowanych na liście JCI (Journal Citation Reports) - ich sumaryczny IF z roku wydania wynosi 11,971, jedna praca przeglądowa to rozdział w monografii. Liczba punktów wszystkich prac znajdujących się na listach czasopism punktowanych Ministerstwa Edukacji i Nauki to 360 - zgodnie z punktacją w wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych stanowiącym załącznik do komunikatu MNiE z dnia 09.02.2021 r.

Zestawienie zostało uzupełnione przez autora o wprowadzenie stanowiące przegląd literatury, hipotezy i cele badawcze (główne i szczegółowe), materiały i opis wykorzystanych metod analitycznych, omówienie wyników i dyskusję oraz ważniejsze wyniki i wnioski. W opracowaniu uwzględniono również streszczenia w języku polskim i angielskim, spis wykorzystanej bibliografii oraz oświadczenia współautorów i wykaz dorobku naukowego niebędącego przedmiotem rozprawy doktorskiej.

Pewien mój niedosyt budzi brak dokumentacji fotograficznej w opracowaniu, jednak oprawa graficzna pracy jest staranna i estetyczna.

Pod względem formalnym i strukturalnym opracowanie nie wzbudza zastrzeżeń.

Ocena pracy pod względem metodycznym

Prace przedstawione w ramach ocenianej rozprawy doktorskiej zostały, w mojej ocenie, przygotowane poprawnie, a podjęte badania były przekrojowe, starannie przemyślane od strony metodycznej i stanowią logiczny ciąg od publikacji przeglądowej, w której omówione zostały mikroorganizmy zdolne do wytwarzania enzymów keratynolitycznych po artykuł dotyczący badań wpływu hydrolizatów keratyny uzyskanych z rozkładu piór na rośliny i aktywność biologiczną gleb uprawnych.

Na tym etapie Doktorant musiał wykazać się znajomością nie tylko klasycznych metod analizy ilościowej i diagnostyki mikrobiologicznej (oznaczanie liczebności grzybów w glebach, izolacja grzybów o potencjale keratynolitycznym, oznaczanie przynależności systematycznej szczepów w oparciu o ich cechy makro i mikroskopowe), ale także procedur różnych analiz fizykochemicznych, chemicznych i biochemicznych (np. oznaczanie aktywności wybranych enzymów, zawartości białek, peptydów, aminokwasów etc.) oraz najnowszych technik molekularnych wykorzystywanych w mikrobiologii do celów diagnostycznych.

Moim zdaniem, metody badawcze zastosowane na każdym etapie eksperymentu (bo pomimo, że wyniki przedstawiono w czterech publikacjach to w mojej ocenie jest to jedno spójne doświadczenie) zostały poprawnie dobrane, a analizy przeprowadzono w sposób właściwy i w wystarczającej liczbie powtórzeń gwarantujących wiarygodność wyników.

Ilość uzyskanych wyników jest przytłaczająca nawet dla czytelnika więc zapewne ich analiza bioinformatyczna i statystyczna, a także interpretacja stanowiła duże wyzwanie dla Doktoranta. Rezultaty wszystkich wykonanych badań przedstawiono graficznie lub zestawiono w tabelach w poszczególnych publikacjach. W mojej ocenie analiza danych jest nie tylko obszerna, ale i dogłębna, co z pewnością zostało docenione już wcześniej przez recenzentów poszczególnych publikacji wchodzących w skład doktoratu.

Ocena merytoryczna pracy

Autor pracy postawił sobie za cel pozyskanie efektywnych szczepów grzybów mogących mieć zastosowanie w procesie utylizacji i przetwarzania pierza odpadowego na biopreparaty o wysokiej wartości użytkującej i nawozowej.

Przygotowując badania Doktorant założył hipotetycznie, że wysoka liczebność w glebach uprawnych określonych gatunków grzybów keratynolitycznych stwarza realne podstawy do wykorzystania tych grzybów dla celów przetwarzania naturalnej keratyny piór w

wysokoazotowe i wysokosiarkowe hydrolizaty z przeznaczeniem jako biostymulatory wzrostu roślin o wysokim zapotrzebowaniu na te składniki oraz jako środki poprawiające aktywność biologiczną gleb - zwłaszcza ubogich w węgiel organiczny.

Dyplomant, w każdej z opublikowanych prac, realizował kolejne cele pośrednie zmierzające do celu nadrzędnego i weryfikacji założonych wcześniej hipotez szczegółowych.

Teoretyczne podstawy związane z celem badawczymi mgr inż. M. T. Możejko przedstawił w artykule przeglądowym oraz we wstępach do wchodzących w skład doktoratu prac naukowych, w których zaprezentował wyniki badań własnych.

Zamierzony cel badawczy Doktorant osiągnął przeprowadzając szereg analiz laboratoryjnych realizowanych w kilku etapach, które zasadniczo odpowiadają celom szczegółowym i wynikiem zamieszczonym w pracach od 2 do 5.

W etapie pierwszym badał skład gatunkowy oraz częstotliwość występowania grzybów keratynofilnych i nie-keratynofilnych zasiedlających skeratynizowane resztki zwierzęce (odpadowe pierze kurcząt) w glebach uprawnych różniących się właściwościami fizykochemicznymi takimi, jak: skład granulometryczny, zawartość substancji organicznej, azotu i innych makroelementów oraz odczynem. Ten etap posłużył również zgromadzeniu szczepów grzybów keratynofilnych do dalszych badań.

W drugim etapie Doktorant przygotował eksperyment dotyczący oceny aktywności keratynolitycznej najliczniej występującego w glebach uprawnych gatunku - *Trichophyton ajelloi*, na podstawie aktywności enzymów keratynolitycznych, mineralnych i organicznych produktów biodegradacji natywnej keratyny, alkalizacji podłoża oraz utraty masy piór w hodowlach wybranej grupy izolatów. Badania służyły także wyselekcjonowaniu najefektywniejszych keratynolitycznie szczepów. Dodatkowym aspektem tych badań była próba powiązania aktywności keratynolitycznej szczepów *Trichophyton ajelloi* ze zdolnością do produkcji rozpuszczalnych pigmentów.

Trzecia część badań dotyczyła optymalizacji parametrów hodowli *Trichophyton ajelloi* w celu przyspieszenia procesu keratynolizy odpadów pierza kurcząt i otrzymania wartościowego preparatu nawożeniowego. W ocenie optymalizacji analizowanych parametrów uwzględniono aktywność enzymów odpowiedzialnych za biodegradację natywnej keratyny piór, utratę masy tych odpadów i stopień alkalizacji podłoża oraz poziom akumulacji organicznych i mineralnych form azotu i siarki.

Etap czwarty to analiza właściwości uzyskanych hydrolizatów keratynowych takich jak fitotoksyczność w stosunku do rzepaku *Brassica napus* L. var. *napus* oraz rzeżuchy *Lepidium*

sativum L., wpływ na aktywność biologiczną gleby (mikrobiologiczną, biochemiczną i enzymatyczną) oraz na kiełkowanie i przyrost biomasy rzepaku (*Brassica napus* L. var. *napus*), a także na wybrane parametry chemiczne gleby.

Mając na uwadze dane zamieszczone w publikacjach, uważam, że postawiony cel pracy został zrealizowany, a uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie stosownych wniosków. Doktorant wykazał zależność pomiędzy licznym występowaniem grzybów keratynofilnych w glebach uprawnych, a ich wysoką aktywnością keratynolityczną. Stwierdził również, że frekwencja najliczniejszego wśród grzybów keratynofilnych gatunku, tj. *Trichophyton ajelloi* zależała od typu gleby, z której pochodziły izolaty oraz pH, zawartości kationów alkalicznych oraz fosforu przyswajalnego i była wysoka w glebach o niskiej zawartości frakcji iłu. Gatunek ten wyraźnie dominował w glebach kwaśnych. Wykazał, że maksimum uwalniania jonów amonowych oraz produkcji siarczanów miało miejsce między 14 i 21 dniem biodegradacji natywnej keratyny piór przez badane grzyby, a szczepem najwydajniejszym pod tym względem okazał się *Trichophyton ajelloi* nr XII. Wprowadzone do gleby piaszczystej, gliniastej i czarnoziemiu hydrolizaty keratynowe nie hamowały kiełkowania nasion roślin testowych *Brassica napus* L. var. *napus* oraz *Lepidium sativum* L. Silniejszą stymulację wzrostu i rozwoju roślin po zastosowaniu hydrolizatu obserwowano w przypadku rzepaku.

Do najważniejszych wyników przeprowadzonych badań należą:

- pozyskanie aktywnego keratynolitycznie szczepu *Trichophyton ajelloi*, który potencjalnie można przygotować w postaci szczepionki przyspieszającej rozkład piór;
- optymalizacja warunków hodowli grzybów *Trichophyton ajelloi* w celu przyspieszenia zagospodarowania odpadowego pierza kurcząt przez grzyby i pozyskania preparatów nawożeniowych;
- wykazanie, że otrzymany na drodze biodegradacji mykologicznej hydrolizat keratynowy, z uwagi na wysoką zawartość rozpuszczalnych białek i peptydów oraz mineralnych form siarki i azotu, może być przydatny do zastosowania jako bionawóz pod uprawę roślin o wysokim zapotrzebowaniu na siarkę.

Mając na uwadze powyższe osiągnięcia uważam, że opublikowane prace stanowią istotny wkład Doktoranta w literaturę przedmiotu dotyczącą możliwości rolniczego zagospodarowania odpadów z produkcji drobiarskiej tym bardziej, iż nadal brakuje

praktycznych rozwiązań problemów dotyczących otrzymywania, zastosowania oraz oceny efektywności działania nawozów, uzyskanych w wyniku mikrobiologicznej biodegradacji i biotransformacji odpadów pierza kurcząt.

Chociaż w pracy przedstawiono liczne wyniki analiz to z całą pewnością wiele zagadnień nadal pozostaje otwartych i daje Doktorantowi możliwości prowadzenia dalszych wnikliwych badań.

W opracowaniu znalazłam zaskakująco nieliczne drobne błędy (głównie edytorskie), co świadczy o wyjątkowej staranności podczas przygotowywania pracy, jednak ze względu na pełnioną funkcję zobowiązana jestem zwrócić na nie uwagę:

- strona 20 - „...wysoka liczebność w glebach uprawnych określonych gatunków grzybów keratynolitycznych, zasiedlających odpadowe pierze kurcząt świadczy o ich wysokiej aktywności keratynolitycznej, co stwarza realne podstawy...” – lepiej brzmiałoby „...wysoka liczebność w glebach uprawnych określonych gatunków grzybów keratynolitycznych zdolnych do zasiedlania odpadowego pierza kurcząt świadczy o ich wysokiej aktywności keratynolitycznej, co stwarza realne podstawy...”;

- strona 21 - „... najliczniej występującego w glebach uprawnych gatunku, reprezentowanego przez *Trichophyton ajelloi*...” – raczej „... najliczniej występującego w glebach uprawnych gatunku - *Trichophyton ajelloi*...”

- strona 25 - „...oczyszczone od wszelkich...” – raczej „...oczyszczone z wszelkich...”;

- strona 32 - może zamiast „metodą wysiewu dziesiętnych rozcieńczeń” lepiej użyć powszechnie stosowanego określenia „metodą seryjnych rozcieńczeń”;

- strona 38 – „bioty grzybów” proponuję zastąpić „mykobioty”;

- strona 93 – „Zgromadzony materiał szczepowy ... sklasyfikowano...” – lepiej chyba „Zgromadzone szczepy/izolaty ... sklasyfikowano...”.

Po szczegółowym przeanalizowaniu pracy nasuwają mi się także następujące pytania, na które oczekuję odpowiedzi od Doktoranta:

- strona 28 – W jaki sposób sprawdzano gęstość zawiesiny zarodników, która używana była do zaszczepiania pożywek?

- Co zdecydowało o wyborze 4 temperatur w eksperymencie (20°C, 28°C, 37°C i 50°C)?

- W jaki sposób można wytłumaczyć fakt (wynikający z przeprowadzonych badań), że pigmentujące szczepy *Trichophyton ajelloi* wykazują silniejszą aktywność keratynolityczną?

- Otrzymane sekwencje porównano z bazą danych UNITE – co zdecydowało o wyborze tej bazy a nie np. SILVA czy GREENGENES?

- W testach fitotoksyczności wykorzystano dwie rośliny z rodziny kapustowatych (*Brassicaceae*) – proszę o uzasadnienie wyboru?

- Jak Pan ocenia realne szanse wytwarzania bionawozu z piór z wykorzystaniem *Trichophyton ajelloi* na dużą skalę?

Wniosek końcowy

Podsumowując recenzję stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa naukowa 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” przygotowana przez mgr inż. Michała Tomasza Możejko stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wskazuje, że autor posiada niezbędną wiedzę teoretyczną, zdolny jest do planowania eksperymentów, opanował techniki laboratoryjne oraz umiejętność prowadzenia pracy badawczej w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo spełniając tym samym wymagania ustawowe stawiane pracom doktorskim w myśl artykułu 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późniejszymi zmianami).

W związku z powyższym wnioskuję do członków Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie mgr inż. Michała Tomasza Możejko do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim. Jednocześnie, mając na uwadze szeroki zakres przeprowadzonych badań, wartość uzyskanych wyników, wysoki poziom merytoryczny opracowania, nowatorstwo oraz potencjał aplikacyjny pracy, wnoszę o jej wyróżnienie.

Dr hab. inż. Maria J. Chmiel, prof. URK



.....