



prof. dr hab. inż. Krystyna Cybulska
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie



Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa

Katedra Bioinżynierii

Pracownia Mikrobiologii i Biochemii Środowiska

ul. Słowackiego 17, 71-434 Szczecin,

tel.: 48 91 449 64 24, tel. kom.: +48 503 123 002, e/mail: krystna.cybulska@zut.edu.pl

Szczecin, dnia 25 lipca 2023r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Michała Tomasza Możejki, pt.

**BADANIA NAD EKOLOGICZNYMI UWARUNKOWANIAMI WYSTĘPOWANIA
SZCZEPÓW KERATYNO LITYCZNEGO GRZYBA *TRICHOPHYTON AJELLOI*
W GLEBACH UPRAWNYCH I ICH UZDOLNIENIAMI DO PRZETWARZANIA
ODPADOWEJ KERATYNY PIERZA NA PREPARATY NAWOŻENIOWE**

Niniejsza recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Michała Możejki pt. Badania nad ekologicznymi uwarunkowaniami występowania szczepów keratyno litycznego grzyba *Trichophyton ajelloi* w glebach uprawnych i ich uzdolnienia do przetwarzania odpadowej keratyny pierza na preparaty nawożeniowe, wykonanej w Katedrze Mikrobiologii Środowiskowej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, której promotorem jest dr hab. Justyna Bohacz, prof. Uczelni, została wykonana na zlecenie Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 31.05.2023r.

Przedstawione do recenzji opracowanie opiera się na czterech publikacjach i jednym artykule zgłódnym do druku:

- [P.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. ISBN: 978-83-7259-344-3.
- [P.2.] Bohacz, J., Możejko, M., Kornilłowicz-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.
- [P.3.] Bohacz, J., Możejko, M. Biodegradation of feather keratin by pigmenting and non-pigmenting fungal strains of *Trichophyton ajelloi* from two soils with different physical and chemical properties.
- [P.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.
- [P.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.

We wszystkich tych pracach udział Doktoranta jest dominujący, wynosi od 50 do 90%. Sumaryczny Impact factor (IF) opublikowania wynosi 11,971 a suma punktów według wykazu MEiN zgodnie z rokiem publikacji: 360. Liczba cytowań łącznie według Web of Science *Core Collection* (WoS), Scopus i Google scholar jest taka sama, wynosi 5 (bez autocytoowań 2).

Opracowanie będące zestawieniem badań obejmuje 299 stron, 179 pozycji literatury, liczne tabele i wykresy. Podzielona jest na rozdziały: STRESZCZENIE i SUMMARY, WPROWADZENIE, HIPOTEZY I CELE BADAŃ, MATERIAŁY I METODY, OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA, WAŻNIEJSZE WYNIKI I WNIOSKI, BIBLIOGRAFIA, OŚWIADCZENIA DOTYCZĄCE WKŁADU W PRZYGOTOWANIE OPUBLIKOWANYCH PRAC NAUKOWYCH, WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO NIEBĘDĄCEGO PRZEDMIOTEM ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.

W warunkach naturalnych liczne substancje keratynowe w znacznych ilościach dostaje się do środowiska. Są one pochodzenia zwierzęcego, jak pióra, włosy czy inne skeratynizowane pozostałości. Nic więc dziwnego, że związki te, jako substancje o charakterze naturalnym są włączane w cykle przemian mineralizacji mikrobiologicznej. Liczne organizmy, wyposażone w odpowiednie enzymy, posiadają zdolność do ich rozkładu. Zgodnie z logiką działania ekosystemów, produkty ich degradacji są wykorzystywane następnie przez rośliny jako substraty pokarmowe, umożliwiające wzrost. Można więc w odniesieniu do powyższych przemian skorygować słynne „*panta rhei*” (wszystko płynie) Heraklita z Efezu na: wszystko krąży (przynajmniej w przyrodzie).

Obecnie, poza naturalnymi źródłami keratyny do środowiska dostają się znaczne jej ilości na skutek działalności gospodarczej człowieka. Produkty odpadowe, jak pióra, włosy, kopyta, czy rogi zwierząt rzeźnych powstają w ogromnych ilościach i stają się znaczącym problemem. A przecież są to substancje potencjalnie użyteczne, zawierające duże ilości wartościowych składników, jak białka, azot czy siarka, szczególnie ważna dla niektórych roślin uprawnych. Pozbycie się uciążliwych odpadów, a raczej wykorzystanie zawartych w nich cennych składników byłoby więc rozwiązaniem dużego problemu z korzyścią dla środowiska jak również dla produkcji rolniczej.

Ta więc biorąc pod uwagę powyższe fakty, należy pozytywnie ocenić wybór tematu rozprawy dokonany przez Doktoranta. Temat jest nie tylko istotny i bardzo ciekawy z punktu widzenia poznawczego, ale także ma duże znaczenie praktyczne.

Oprócz fragmentów będących przedstawieniem stanu wiedzy w przedmiocie badań, zamieszczonych w publikacjach, będących podstawą dysertacji, Doktorant zamieszcza w przedstawionym opracowaniu rozdział WPROWADZENIE, który jest w istocie przeglądem literatury. Na marginesie – nie wiem dlaczego, ale zaznacza się ostatnio dziwna tendencja do nazywania przeglądu literatury różnymi innymi nazwami, byle tylko nie użyć terminu: „PRZEGLĄD LITERATURY”. Wprowadzenie jest bardzo ogólnym tytułem, podczas gdy przegląd literatury w pracy naukowej precyzyjnie definiuje zawartą treść.

Wspomniane wprowadzenie zawiera informacje o pochodzeniu i ilościach substancji keratynowych dostających się do środowiska i powstających jako odpady i omawia sposoby zagospodarowania tych odpadów. Następnie dokonuje przeglądu organizmów przeprowadzających degradację keratyny, ze szczególnym uwzględnieniem grzybów. Krótko wspomina o mechanizmie biodegradacji przez te ostatnie organizmy oraz o metodach pomiaru szybkości tej biodegradacji. Następnie wspomina o znaczeniu siarki dla roślin określanych jako siarkolubne, wreszcie krótko opisuje biopreparaty będące hydrolizatami substancji keratynowych i ich zastosowanie w nawożeniu roślin. Rozdział ten nie jest zbyt obszerny, ale przedstawia w wystarczający sposób aktualny stan wiedzy i uzasadnia wybór tematyki badań. Literatura przedmiotu dobrana jest prawidłowo i jakkolwiek w znacznej mierze cytowane publikacje pochodzą z ośrodka naukowego w którym Doktorant wykonywał badania (jest to ośrodek znaczący w badaniach nad tym tematem), to również przedstawia liczne informacje z literatury światowej, co świadczy o dobrej orientacji w wynikach prac innych badaczy oraz aktualnym stanie wiedzy.

Rozdział HIPOTEZY I CELE BADAŃ przedstawia hipotezy główne i szczegółowe oraz założenia i cele badań.

Nadrzędnym celem prezentowanych badań, prowadzonych jako doświadczenia laboratoryjne i modelowe, było pozyskanie efektywnych szczepów grzybów mogących mieć zastosowanie w procesie utylizacji i przetwarzania pierza odpadowego na biopreparaty o wysokiej wartości użyźniającej i nawozowej.

Hipoteza badawcza polegała na założeniu wysokiej liczebności grzybów keratynolitycznych w glebach uprawnych oraz ich wysokiej aktywności keratynolitycznej, co umożliwia wykorzystania ich do przetwarzania keratyny piór w hydrolizaty przeznaczone do biostymulacji wzrostu roślin, zwłaszcza gatunków wysokim zapotrzebowaniu na azot i siarkę oraz poprawiające aktywność biologiczną gleb. Dla weryfikacji elementów hipotezy Doktorant zaplanował serię publikacji. Przyjął dla nich hipotezy szczegółowe:

- Obecność grzybów keratynofilnych i nie-keratynofilnych, w glebach uprawnych warunkowane jest właściwościami chemicznymi i fizycznymi gleby.
- Szczepy dominującego gatunku keratynolitycznego *Trichophyton ajelloi* różnią się aktywnością keratynolityczną.
- Optymalizacja warunków hodowli i składu podłoża grzyba *Trichophyton ajelloi* pozwoli przyspieszyć biodegradację pozwoli na uzyskania bioproduktu o wysokiej wartości nawozowej; .
- W wyniku biodegradacji powstaje hydrolizat keratynowy, który jest szczególnie przydatny jako bionawóz dla roślin siarkolubnych, równocześnie stymulujący aktywność biologiczną gleby.

Weryfikacja hipotez badawczych przeprowadzona została w kolejnych etapach badań, opisanych w publikacjach:

- Publikacja 1. Przegląd literatury dotyczącej mikroorganizmów keratynolitycznych, charakterystyka enzymów keratynolitycznych oraz ogólnego mechanizmu rozkładu natywnej keratyny.
- Publikacja 2. Poznanie składu rodzajowego i gatunkowego, oraz częstotliwości występowania grzybów keratynofilnych i nie-keratynofilnych w glebach uprawnych.
- Publikacja 3. Ocena aktywności keratynolitycznej szczepów dominującego gatunku *Trichophyton ajelloi*.

- Publikacja 4. Określenie optymalnych parametrów składu podłoża oraz warunków hodowli szczepów *Trichophyton ajelloi*, oraz uzyskanie biopreparatu nawozowego.
- Publikacja 5. Zbadanie wpływu hydrolizatów keratynowych co do ich fitotoksyczności oraz oddziaływania na wzrost roślin i aktywność biologiczną gleby.

Hipotezy i cele są sformułowane jasno i poprawnie. Wynikają logicznie z aktualnego stanu wiedzy i są ze sobą logicznie powiązane. Stanowią dobrą podstawą do planowania i przeprowadzenia badań.

Rozdział MATERIAŁY I METODY zawiera charakterystykę użytych w badaniach gleb, substratu keratynowego, uwzględnionych w badaniach szczepów, hydrolizatu keratynowego oraz roślin. Dokładnie opisane są metody analityczne wykorzystane przy identyfikacji gatunkowej grzybów, określaniu ich aktywności keratynolitycznej, fitotoksyczności i biologicznej aktywności gleby, wreszcie użyte metody statystycznej weryfikacji uzyskanych wyników.

Wszystkie użyte metody są poprawnie dobrane z punktu widzenia celu badań i dokładnie opisane. Należy podkreślić, że Doktorant wykazał się dużym opanowaniem bardzo zróżnicowanych metod pracy w laboratorium, zarówno mikrobiologicznych, jak też biochemicznych i z zakresu doświadczalnictwa rolniczego. Zwraca też uwagę swobodne i właściwe posługiwaniem się metodami interpretacji statystycznej wyników badań. Wykonane przez Doktoranta badania wskazują na doskonałe opanowanie przez niego pracy laboratoryjnej, planowania doświadczeń i wielu aspektów analityki.

W badaniach Doktorant uzyskał ogromną ilość wyników, które przedstawił niezmiernie szczegółowo i obszernie (rozdział OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA). Wyniki te są ilustrowane niezwykle licznymi tabelami i wieloma wykresami, opracowanie zawiera też ogromem danych źródłowych zamieszczonych w załączniku. Opis jest bardzo obszerny i jasny, nie budzi zastrzeżeń. Doktorant umiejętnie przedstawił stwierdzone w badaniach fakty i tendencje, co nie było proste ze względu na wspomniany ogrom zebranych podczas badań informacji. Równocześnie dokonuje dyskusji uzyskanych wyników, przez porównanie z wynikami prac innych badaczy wykonanych w tej samej lub zbliżonej tematyce. Pozwala to na właściwą ocenę Jego badań. W sposób umiejętny posługuje się literaturą i swoją własną wiedzą, podejmując próby wyjaśnienia ewentualnych różnic czy odchyłeń w stwierdzonych przez siebie zależnościach od innych wyników albo też tłumacząc przyczyny stwierdzonych tendencji i obserwowanych przemian. Jest to mocna strona recenzowanej pracy.

W związku z powyższym, przedstawione w rozdziale WAŻNIEJSZE WYNIKI I WNIOSKI stwierdzenia są dobrze udokumentowane i wyjaśnione. Zamieszczone tam stwierdzenia i wnioski są bardzo obszerne a także liczne – obejmują aż 22 pozycje. Ilość tą trochę uzasadnia objętość pracy i zakres badań, jednak poszczególne punkty tego rozdziału są tak obszerne, że połączone razem mogłyby stanowić właściwie raczej podsumowanie badań. Sądzę, że opracowanie bardziej syntetycznych wniosków ułatwiłoby zorientowanie się w najważniejszych rezultatach przeprowadzonych badań i kluczowych osiągnięciach Doktoranta.

Do najważniejszych osiągnięć Autora należy zaliczyć:

- Wykazanie powiązania pomiędzy licznym występowaniem grzybów keratynofilnych w glebach uprawnych, a ich wysoką aktywnością keratynolityczną.
- Wykazanie powiązania występowania grzybów keratynofilnych z różnymi właściwościami fizyko-chemicznymi gleb, ze szczególnym uwzględnieniem składu granulometrycznego.
- Scharakteryzowanie występowania w mikoflorze czterech różnych gleb grzybów keratynofilnych i nie-keratynofilnych i przedstawienie różnic w tym zakresie pomiędzy tymi glebami.
- Ustalenie warunków glebowych sprzyjających występowaniu grzybów keratynofilnych.
- Wskazanie gatunków dominujących wśród grzybów keratynofilnych i nie-keratynofilnych, oraz uznanie pH gleby za czynnik determinujący skład gatunkowy.
- W odniesieniu do gatunku *Trichophyton ajelloi* wykazanie iż jego liczebność była uzależniona od pH gleb, zawartości kationów alkalicznych oraz fosforu przyswajalnego a także zawartości frakcji iłu.
- Określenie aktywności keratynolitycznej 37 szczepów *Trichophyton ajelloi* i jej zależności od typu gleby, z której były wyizolowane a także ich właściwości fizjologicznych.
- Powiązanie intensywności biodegradacji pierza przez szczepy *Trichophyton ajelloi* z ich zdolnością do wydzielania pigmentu.
- Określenie wpływu składu podłoża i warunków hodowli grzybów *Trichophyton ajelloi* na biodegradację pierza kurcząt oraz określenie optymalnych warunków dla tego procesu.
- Ustalenie optymalnych warunków dla zmaksymalizowania ilości jonów amonowych w hydrolizacie.

- Wykazanie przydatności hydrolizatu keratyny jako biomawozu, zwłaszcza dla roślin o wysokim zapotrzebowaniu na siarkę a także wpływie tego bionawozu w kierunku poprawy aktywności biologicznej gleby, oraz o braku jego fitotoksycznego oddziaływania.
- Stwierdzenie zwiększenia puli glebowego dsDNA pod wpływem hydrolizatu keratynowego, skorelowanej z liczebnością większości badanych grup drobnoustrojów.
- Stwierdzenie stymulacji aktywności respiracyjnej, aktywności dehydrogenaz i alkalicznej fosfatazy oraz aktywności proteazy i fosfatazy kwaśnej po zastosowaniu hydrolizatu keratynowego.
- Stwierdzenie zwiększenia biomasy rzepaku (*Brassica napus* L. var. *napus*) po zastosowaniu hydrolizatu keratynowego.

Przedstawioną rozprawę doktorską mgr inż. Michała Możejki oceniam wysoko, jako bardzo dobrze zaplanowaną. Kolejne etapy badań są logicznie powiązane, każdy z nich wynika z poprzedniego i opiera się na nim, prowadząc do rozwiązania postawionego na początku problemu. Praca jest poprawnie wykonana dzięki znajomości technik i metodyk laboratoryjnych i poprawnym ich doborze. Jest też dobrze napisana i zinterpretowana. Wszystko to świadczy o dużej wiedzy w tematyce badań, dobrym warsztacie metodycznym oraz dojrzałości naukowej. Pozwala to stwierdzić, że Doktorant jest młodym, wartościowym badaczem, przygotowanym do pracy naukowej.

Z obowiązku recenzenta chcę wspomnieć o niedociągnięciach, których Doktorant nie ustrzegł się w swojej rozprawie doktorskiej (mam na myśli zwłaszcza opracowanie podsumowujące).

Mam zastrzeżenia do przedstawionych w opracowaniu rycin. Są one wprawdzie wykonane w kolorach, ale mimo to poszczególne krzywe zlewają się, punkty nakładają na siebie i nie są czytelne. Należałoby zastosować taką formę prezentacji wyników, która pozwoli na jasne przedstawienie danych, nie pozostawiając czytelnika bezradnego lub zmuszania go do rozszyfrowania tych wykresów samodzielnie (co jest możliwe dzięki zamieszczeniu w pracy bogatego materiału źródłowego).

Jakkolwiek Doktorant dobrze posługuje się metodami statystycznej interpretacji danych i na ogół prezentując swoje wyniki wykorzystuje uzyskane przy pomocy tych metod oceny (np. poziom istotności, korelacja) to zdarza się, iż mówi o różnicy w wynikach bez podawania ich istotności.

Drobna sprawa – komponenta czy komponent? Na str. 13 Autor używa określenia „komponentę”. Wydawało mi się zawsze, że słowo to jest rodzaju męskiego.

W całym tekście pracy zauważa się, że Doktorant używa terminów „grzyby keratynolityczne” oraz „grzyby keratynofilne”. Odniosłam wrażenie, że są one używane zamiennie, jako synonimy. Nigdzie też nie znalazłam w pracy definicji tych określeń. Jeśli oznaczają to samo, to po co dwa terminy? Wydaje mi się jednak, że jako grzyby keratynolityczne określamy gatunki mające zdolność do samodzielnej biodegradacji keratyny, wyposażone w zestaw odpowiednich enzymów, natomiast gatunki keratynofilne to grzyby towarzyszące keratynolitycznym, mające niepełne spektrum enzymatyczny do tego procesu lub korzystające z różnych metabolitów pośrednich procesu keratynolizy.

I jeszcze jedna uwaga pod rozważę Autora. Do oceny procesu biodegradacji użyte były różne wskaźniki. Wydaje się, że wyniki tych badań zostały w niewielkim stopniu wykorzystane w pracy. Jeżeli do pomiaru wykorzystuje się kilka, często bardzo różnych wskaźników, to robi się to przeważnie w pracach metodycznych, zmierzających do znalezienia najlepszego sposobu pomiaru (zwłaszcza jeśli pomiar bezpośredni jest trudny lub niemożliwy). Wtedy też oblicza się korelację pomiędzy wynikami uzyskanymi przy pomocy różnych metod a wynikami uzyskanymi z pomiaru bezpośredniego interesującego nas procesu. Można na tej podstawie stwierdzić, który z przebadanych metod najlepiej oddaje wyniki uzyskane przez pomiar bezpośredni. W przypadku badań Doktoranta zastosowany był prosty sposób pomiaru bezpośredniego postępów biodegradacji – ubytek masy keratyny. Po cóż więc dodatkowe parametry? Albo, jeśli były potrzebne to jaki z nich w wyniku badań Doktoranta okazał się najbardziej przydatny czy wiarygodny? A jeżeli nie taki był zamiar, a celem raczej stwierdzenie np. jak przebiegało uwalnianie jonów amonowych podczas biodegradacji keratyny, to czy można mówić o pomiarze ilości tych jonów w hydrolizacie jako wskaźniku przebiegu biodegradacji? Zdaję sobie sprawę, że niniejsze rozważania mają charakter dyskusyjny, jednak zamieszczam je przedkładając pod rozważę Doktoranta.

Wszystkie powyższe uwagi dotyczą drobnych lub dyskusyjnych zagadnień i nie zmniejszają wartości pracy.

Podsumowując można stwierdzić, że Pan mgr inż. Michał Możejko dobrze zaplanował swoje badania i jasno postawił istotne cele badawcze. Metody laboratoryjne były dobrze dobrane z uwzględnieniem celu wykonanie poprawne. Bardzo dokładnie zostały przedstawione wyniki. Wykresy dosyć poprawne a tabele czytelne, i bardzo obszerne. Właściwa jest też interpretacja statystyczna wyników. Wyniki przedyskutowane i omówione a także zinterpreto-

wane w sposób nie budzący zastrzeżeń. Wykonane przez Doktoranta badania są cenne dla nauki ale mają też znaczenie praktyczne. Wszystko to świadczy, że Pan mgr inż. Michał Możejko posiada dużą wiedzę w zakresie dyscypliny którą się zajmuje, ma umiejętność prowadzenia badań naukowych na wysokim poziomie i właściwej prezentacji uzyskanych wyników.

Przedmiotem recenzji jest rozprawa doktorska, i nie sposób jednak nie wspomnieć o pozostałych osiągnięciach Doktoranta. Są to:

- Publikacje w czasopismach naukowych ujętych w wykazie MEiN i posiadających Impact Factor: 3.
- Rozdziały w monografiach naukowych wydawanych przez wydawnictwa ujęte w wykazie MEiN: 3.
- Publikacje popularnonaukowe: 1.
- Referaty wygłoszone na konferencjach o zasięgu międzynarodowym: 2.
- Referaty wygłoszone na konferencjach o zasięgu ogólnopolskim: 6.
- Postery prezentowane na konferencjach o zasięgu ogólnopolskim: 1.
- Współautorstwo doniesień prezentowanych w formie posterów na konferencjach o zasięgu międzynarodowym: 2.
- Współautorstwo doniesień prezentowanych w formie posterów na konferencjach o zasięgu ogólnopolskim: 9.
- Nagrody i wyróżnienia: 3 wyróżnienia za prezentacje na konferencjach.
- Wnioski projektowe i udział w projektach: udział w 3 projektach i 1 złożony wniosek.

Wniosek końcowy: Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska autorstwa mgr inż. Michała Możejki pt. *Badania nad ekologicznymi uwarunkowaniami występowania szczepów keratynolitycznego grzyba *Trichophyton ajelloi* w glebach uprawnych i ich uzdolnienia do przetwarzania odpadowej keratyny pierza na preparaty nawożeniowe spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, zgodnie z Ustawą z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Dz.U. z 2022r poz. 574 ze zm. biorąc pod uwagę jej treść, kwalifikuje Doktoranta do ubiegania się o stopień naukowy doktora w dziedzinie Nauk Rolniczych w dyscyplinie Rolnictwo i ogrodnictwo. Na tej podstawie stawiam wniosek o dopuszczenie Pana mgr inż. Michała Możejki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.*

Ze względu na prawidłowe zaplanowanie kompleksowych badań o bardzo szerokim zakresie, poprawne wykonanie i wzorowe opisanie, interpretację i przedyskutowanie otrzymanych wyników, a także uzyskanie bardzo wartościowych wyników, zarówno poznawczo jak też z punktu widzenia praktycznego, wnioskuję o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

Szczecin, 25.07.2023r.

prof. dr hab. inż. Krystyna Cybulska

