



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
WYDZIAŁ NAUK o ŻYWNOŚCI i ŻYWIENIU
Katedra Technologii Żywności
Pochodzenia Roślinnego
Pracownia Fermentacji i Biosyntezy

Poznań, 6 sierpnia 2026 r.

Prof. dr hab. inż. Agnieszka Piotrowska-Cyplik

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Natalii Rutkowskiej

pt.: „Bakterie endofityczne *Galium aparine* L. – analiza biosyntetycznych klastrów genów i ich znaczenie w produkcji związków bioaktywnych”

przygotowana pod promotorstwem dr hab. Olgi Marchut-Mikołajczyk, prof. uczelni oraz promotora pomocniczego dr hab. Bartosza Sekuły prof. uczelni,

przedstawiona do oceny jako pięć spójnych tematycznie publikacji naukowych, w tym cztery prace oryginalne zawierające wyniki przeprowadzonych badań.

Podstawą do sporządzenia niniejszej recenzji jest pismo z dnia 22 czerwca 2026 r. wystosowane przez Dziekan Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej prof. dr hab. Edytę Gendaszewską-Darmach.

1. Podstawowe dane o Kandydatce

Pani mgr inż. **Natalia Rutkowska** jest absolwentką Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej, na którym w 2021 r. ukończyła studia pierwszego stopnia na kierunku biotechnologia, a następnie w 2022 r. uzyskała tytuł zawodowy magistra inżyniera na kierunku biotechnologia, w specjalności biotechnologia molekularna i przemysłowa. W lipcu 2023 roku ukończyła studia drugiego stopnia na kierunku biologia, specjalność genetyka na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Obecnie realizuje kształcenie w Szkole Doktorskiej Politechniki Łódzkiej w dyscyplinie nauk biologicznych. Nadesłana do oceny dokumentacja oraz źródła dodatkowe, sprawdzone przez recenzenta, nie wskazują, aby Kandydatka ubiegała się uprzednio o nadanie stopnia doktora.

2. Ocena formalna pracy oraz dotycząca statusu pięciu prac

Rozprawa ma charakter hybrydowy łączący w sobie dwie publikacje i trzy manuskrypty nieopublikowanych prac. Stanowi obszerne, niejednolite opracowanie obejmujące 225 stron maszynopisu wraz z oświadczeniami w formie załączników. Została formalnie określona jako cykl pięciu tematycznie powiązanych prac: jednej pracy przeglądowej oraz czterech oryginalnych prac badawczych.

W wykazie prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej znajduje się: publikacja pierwsza (P1) która jest pracą przeglądową opublikowaną w International Journal of



Molecular Sciences w 2023 r. (udział merytoryczny Doktorantki oszacowany na 80%) i druga (P2) oryginalna praca badawcza opublikowana we Frontiers in Microbiology w 2025 r. (udział merytoryczny Doktorantki oszacowany na 70%). Natomiast publikacje trzecia, czwarta i piąta, oznaczone odpowiednio jako P3 (udział merytoryczny Doktorantki oszacowany na 60%), P4 (udział merytoryczny Doktorantki oszacowany na 80%) oraz P5 (udział merytoryczny Doktorantki oszacowany na 65%) opisano jako znajdujące się w recenzji. Z dodatkowo zweryfikowanego przeze mnie źródła wynika, że czwarta publikacja, oznaczona jako P4, została opublikowana 17 czerwca 2026 r. w BMC Genomics (Wydawnictwo Springer), lecz w chwili przekazania całości materiału do recenzji doktoratu, nie była jeszcze ostateczną, zredagowaną wersją wydawniczą. Z formalnego punktu widzenia nie jest właściwe przedstawianie manuskryptów pozostających w recenzji jako publikacji. W chwili przekazania rozprawy do oceny recenzenckiej wydane były tylko dwie publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej spośród pięciu spójnych tematycznie. Prace P3, P4 i P5 pozostawały w formie manuskryptów. Właściwsze byłoby zatem określenie rozprawy jako formy hybrydowej, obejmującej część opublikowaną oraz część nieopublikowaną.

Uwaga ta ma charakter formalny i nie podważa ona wartości danych ani wkładu Doktorantki. Uwzględniłam ponadto w tym zakresie realia długotrwałego procesu publikacyjnego oraz krótki czas kształcenia w szkole doktorskiej. Niemniej jednak w dokumentacji stopnia naukowego należy konsekwentnie odróżniać publikację, artykuł zaakceptowany do druku oraz manuskrypt złożony lub recenzowany.

3. Spójność i ogólna charakterystyka rozprawy

Rozprawa dotyczy bakterii endofitycznych wyizolowanych z tkanek przytulii czepnej (*Galium aparine* L.), ze szczególnym uwzględnieniem przedstawicieli rodziny *Bacillaceae*. Oś badawcza została poprowadzona od izolacji i identyfikacji szczepów, poprzez sekwencjonowanie genomów i analizę ich potencjału metabolicznego, aż po eksperymentalną walidację wybranych cech promujących wzrost roślin, ocenę biosyntezy metaloforów, optymalizację procesu syntezy przez mikroorganizmy oraz wstępną próbę zastosowania oczyszczonego materiału w warunkach stresu wywołanego metalami ciężkimi.

Tak zaprojektowana sekwencja badań jest logiczna i merytorycznie spójna, co w konsekwencji pozwoliło Doktorantce zweryfikować przyjęte na początku pracy hipotezy badawcze oraz zrealizować założone cele doktoratu. Stwierdzam, że generalnie poprawnie scharakteryzowano i zidentyfikowano taksonomicznie bakterie endofityczne wyizolowane z tkanek przytulii czepnej, co stanowiło podstawowy cel pracy, a także wytypowano na podstawie analiz genomowych spośród nich szczep o najwyższym potencjale do produkcji metaloforów. Praca nie stanowi przypadkowego zestawienia artykułów, lecz rozwija jedną spójną koncepcję badawczą, zgodnie z którą rośliny zielne, w tym przytulia czepna, mogą być źródłem endofitów o wartościowym potencjale biosyntetycznym, który można rozpoznać metodami genomiki, a następnie zweryfikować doświadczalnie. Za szczególnie wartościowe i zasługujące na uznanie uważam połączenie analiz *in silico* z badaniami laboratoryjnymi w przedłożonej do oceny pracy doktorskiej. W wielu pracach z zakresu genome mining kończy się bowiem na katalogowaniu przewidywanych genów lub klastrow, natomiast w tej rozprawie podjęto próbę przejścia od predykcji do fenotypu, a następnie do zastosowania



otrzymanych wyników i wstępnie wypracowanych rozwiązań w celu poprawy warunków uprawy roślin.

4. Dobór i znaczenie tematu

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Natalii Rutkowskiej dotyczy istotnej z punktu widzenia badań podstawowych problematyki wykorzystania bakterii endofitycznych o szerokim potencjale aplikacyjnym w rolnictwie oraz biotechnologii środowiskowej. Potencjał bakterii endofitycznych do syntezy związków bioaktywnych, w tym metaloforów wspierających wzrost roślin oraz zwiększających ich tolerancję na stres wywołany obecnością metali ciężkich, uwidacznia możliwość zastosowania tych szczepów jako naturalnych biostymulatorów oraz elementów zrównoważonej strategii poprawy jakości gleb i, w konsekwencji, jakości oraz wydajności plonów. Ponadto tematyka wiąże się również z pozyskiwaniem naturalnych metabolitów mikrobiologicznych, genomowym rozpoznawaniem biosyntetycznych klastrów genów oraz badaniami aplikacyjno-wdrożeniowymi, tj. biologicznymi metodami ograniczania skutków zanieczyszczenia gleb metalami. Wybrany przez Doktorantkę temat dysertacji należy do aktualnych kierunków z zakresu mikrobiologii, biotechnologii środowiskowej oraz nauk o produkcji żywności. Z punktu widzenia dyscypliny technologii żywności i żywienia istotne jest powiązanie zdrowia i produktywności roślin z bezpieczeństwem surowców, ograniczaniem presji chemicznych środków produkcji oraz zmniejszeniem ryzyka przenoszenia zanieczyszczeń w łańcuchu żywnościowym.

Zastosowanie antiSMASH i narzędzi porównujących biosyntetyczne klastry genów (BGC) jest zgodne ze współczesnym warsztatem rozwijanego powszechnie w badaniach genomowego rozpoznawania genów (genome mining). Jednocześnie literatura podkreśla, że wykrycie klastra genów jest predykcją potencjału, a nie dowodem na produkcję określonego metabolitu. Dlatego szczególnie pozytywnie oceniam próbę walidacji laboratoryjnej. Należy jednak zachować ostrożność w przypisywaniu konkretnej struktury chemicznej wyłącznie na podstawie obecności homologicznych genów, testów barwnych oraz widm UV-Vis. Pełna identyfikacja produktu wymagałaby co najmniej wysokorozdzielczej spektrometrii mas, a w przypadku nowej cząsteczki również NMR oraz analizy stereochemicznej.

Wybór przytulii czepnej do badań jest interesujący i oryginalny. Roślina ta jest pospolita, lecz jej mikrobiom endofityczny nie był wcześniej dobrze scharakteryzowany. Rodzi się w tym momencie u mnie jednak pytanie o wyjaśnienie, jakimi dodatkowymi przesłankami kierowała się Doktorantka, wybierając przytulię czepną na obiekt swych badań? Wartość nowości wynika więc nie z samego faktu badania endofitów *Bacillaceae*, lecz z powiązania nieopisanego gospodarza, pełnych genomów izolatów, predykcji BGC oraz badań nad metaloforami. Wybór tematyki rozprawy mgr inż. Natalii Rutkowskiej uważam za trafny, aktualny oraz istotny, zwłaszcza w aspekcie aplikacyjnym. Doktorantka w swych badaniach uwzględniła nie tylko skalę laboratoryjną, ale, co najistotniejsze, przedstawiła wstępne wyniki badań z roślinami.

5. Ocena koncepcji naukowej, celów i hipotez

Cele pracy układają się w ciąg logiczny i są możliwe do prześledzenia w kolejnych pracach: identyfikacja taksonomiczna endofitów, analiza genomowego potencjału



biosyntetycznego, walidacja wybranych aktywności, wskazanie szczepu o najwyższym potencjale metaloforowym, optymalizacja produkcji oraz wstępna ocena aplikacyjna. Zastrzeżenie budzi miejscami zbyt daleko idący i szeroko rozbudowany język hipotez oraz wniosków. Obecność genów związanych z daną funkcją nie przesądza o ich ekspresji, aktywności enzymatycznej ani znaczeniu ekologicznym. Podobnie produkcja związku chelatującego w pożywce laboratoryjnej nie jest równoznaczna z efektywną bioremediacją w glebie. W rozprawie powinno się konsekwentnie rozróżniać: potencjał genetyczny, wykazaną aktywność *in vitro*, efekt w modelu doniczkowym oraz potwierdzoną użyteczność agronomiczną.

Dwa izolaty – *Priestia* sp. GS2 i *Bacillus* sp. GL1 – określono jako prawdopodobnie reprezentujące nowe gatunki. Jest to interesujący wynik, ale do formalnego opisu nowych gatunków potrzebna byłaby pełna charakterystyka, depozycja szczepów typowych w kolekcji oraz spełnienie wymogów nomenklaturowych. Sformułowanie „potencjalnie nowe gatunki” jest zatem dopuszczalne; nie należy jednak przedstawiać ich nowości taksonomicznej jako ostatecznie rozstrzygniętej.

6. Ocena metodologii, wyników i wartości naukowej rozprawy

Zastosowana metodyka jest w większości właściwie dobrana do założonych celów badawczych i obejmuje nowoczesne podejście łączące klasyczną mikrobiologię, genomikę, bioinformatykę oraz eksperymentalną walidację właściwości biologicznych badanych szczepów. Szczególnie wysoko należy ocenić wykorzystanie hybrydowego sekwencjonowania całego genomu, które zapewnia znacznie większą wiarygodność identyfikacji taksonomicznej niż analiza genu 16S rRNA.

W części dotyczącej izolacji endofitów zabrakło jednak jednoznacznego wykazania skuteczności sterylizacji powierzchniowej tkanek roślinnych poprzez zastosowanie odpowiednich kontroli. Większość doświadczeń fenotypowych miała charakter przesiewowy i jakościowy, dlatego w wielu przypadkach wskazane byłoby ich uzupełnienie o pomiary ilościowe, analizę kinetyki wzrostu oraz doświadczenia wazonowe lub polowe potwierdzające potencjał aplikacyjny badanych szczepów.

Na szczególne uznanie zasługuje wykorzystanie licznych narzędzi bioinformatycznych do identyfikacji biosyntetycznych klastrów genów (BGC). Interpretacja wyników wymaga jednak większej ostrożności, ponieważ obecność homologicznych genów nie stanowi dowodu ekspresji klastra genów ani biosyntezy przewidywanego metabolitu. W przypadku przewidywanych metaloforów konieczna pozostaje eksperymentalna identyfikacja produktu oraz potwierdzenie funkcji kluczowych enzymów.

Podobnie zastosowane testy CAS należy traktować jako metody przesiewowe określające względną aktywność chelatującą, a nie jako bezpośredni pomiar ilości konkretnego metaloforu. Określenie „oczyszczony metalofor” jest obecnie zbyt daleko idące, gdyż nie przedstawiono pełnej charakterystyki chemicznej produktu.

Wykorzystano metodę Taguchiego do optymalizacji procesu produkcji, jednak ze względu na ograniczoną możliwość oceny interakcji pomiędzy czynnikami doświadczenie mogłoby



zostać uzupełnione o analizę powierzchni odpowiedzi (RSM). W modelu roślinnym z wykorzystaniem buraka zwyczajnego (*Beta vulgaris*) uzyskano interesujące wyniki, jednak doświadczenie ma charakter wstępny i wymaga rozszerzenia o dłuższe obserwacje, oznaczenia zawartości metali w roślinach oraz doświadczenia prowadzone w warunkach bardziej zbliżonych do środowiska naturalnego.

Analizy statystyczne zastosowane w pracach są poprawne, jednak w części doświadczeń bardziej odpowiednie byłyby modele wieloczynnikowe lub mieszane, pozwalające uwzględnić jednocześnie wpływ szczepu, podłoża i czasu oraz ich wzajemnych interakcji. Konieczne jest również wyraźniejsze rozróżnienie powtórzeń biologicznych od technicznych.

Ocena poszczególnych publikacji i/lub prac badawczych

Publikacja przeglądowa (P1) stanowi wartościowe opracowanie aktualnego stanu wiedzy dotyczącego roli endofitów jako potencjalnych producentów związków bioaktywnych. Jej największą wartością jest uporządkowanie literatury oraz stworzenie naukowego uzasadnienia dla dalszych badań eksperymentalnych.

Najmocniejszym elementem całego cyklu jest publikacja druga (P2), opublikowana w *Frontiers in Microbiology*. Praca przedstawia pierwszą kompleksową charakterystykę hodowalnych endofitów rodziny *Bacillaceae* wyizolowanych z przytulii czepnej oraz ich analizę genomową. W pracy skupiono się na: hybrydowym sekwencjonowaniu genomów, zastosowaniu nowoczesnych analiz taksonomicznych, identyfikacji biosyntetycznych klastrów genów, analizie elementów mobilnych i genów związanych z adaptacją endofityczną oraz udostępnianiu danych genomowych w bazie NCBI.

Praca trzecia (P3) stanowi cenne rozszerzenie badań genomowych o charakterystykę fenotypową szczepów oraz ocenę ich właściwości promujących wzrost roślin. Jej głównym ograniczeniem pozostaje dominacja testów jakościowych oraz obecność zbyt daleko idących interpretacji, które nie znajdują pełnego potwierdzenia w przedstawionych wynikach.

Praca czwarta (P4), opublikowana w *BMC Genomics*, prezentuje bardzo wartościowe i oryginalne badania dotyczące biosyntezy metaloforów oraz organizacji odpowiednich klastrów genowych. Stanowi istotne połączenie analiz genomowych z walidacją eksperymentalną. Wymaga jedynie doprecyzowania interpretacji wyników testów CAS oraz zachowania większej ostrożności przy identyfikacji przewidywanego typu metaloforu.

Praca piąta (P5) ma największy potencjał aplikacyjny, obejmując optymalizację procesu produkcji, częściowe oczyszczanie produktu oraz ocenę jego wpływu na kiełkowanie i wzrost roślin w warunkach stresu metalami ciężkimi. Jest jednocześnie najsłabszym metodologicznie elementem cyklu, ponieważ część wniosków wykracza poza zakres przedstawionych dowodów eksperymentalnych i wymaga dalszej walidacji chemicznej oraz biologicznej.

Pomimo wskazanych uwag metodycznych i interpretacyjnych rozprawa prezentuje wysoki poziom naukowy, wnosi oryginalne wyniki do badań nad bakteriami endofitycznymi



oraz posiada istotny potencjał aplikacyjny w obszarze zrównoważonego rolnictwa i biotechnologii środowiskowej.

Lektura kolejnych części rozprawy doktorskiej mgr inż. Natalii Rutkowskiej obok bardzo pozytywnej oceny nasuwa następujące uwagi.

1. Nieprawidłowe formalne przedstawienie manuskryptów P3, P4 i P5 jako cyklu publikacji.
2. Zbyt kategoriyczne utożsamianie predykcji BGC z produkcją konkretnego metabolitu.
3. Brak pełnej identyfikacji strukturalnej oraz oceny czystości produktu określanego jako oczyszczony metalofor.
4. Niewystarczające informacje o jednostkach eksperymentalnych. Uproszczona analiza statystyczna układów wieloczynnikowych.
5. Brak oznaczenia rzeczywistej biodostępności oraz pobrania metali w doświadczeniu glebowym.
6. Ograniczone omówienie biobezpieczeństwa szczepów należących do grupy *Bacillus cereus*.
7. Liczne drobne błędy językowe, interpunkcyjne i edytorskie w manuskryptach P3 – P5.
8. Miejscami spekulacyjna dyskusja, szczególnie dotycząca wpływu sąsiedztwa lotniska.
9. Niejednolity i nie zawsze wystarczająco czytelny sposób graficznego przedstawienia danych.

Pytania do Doktorantki na obronę publiczną:

1. Jakie przesłanki wzięto pod uwagę przy wyborze przytulii czepnej na obiekt badań?
2. Jakie kontrole zastosowano, aby potwierdzić skuteczność sterylizacji powierzchniowej tkanek przytulii czepnej i wykluczyć izolację epifitów?
3. Jakie dodatkowe badania byłyby niezbędne do formalnego opisania *Priestia* sp. GS2 i *Bacillus* sp. GL1 jako nowych gatunków?
4. Na jakiej podstawie szczep *Priestia* sp. GS2 nazwano metaloforem typu opinowego i jakie analizy są potrzebne do potwierdzenia jego struktury?
5. Jakie są najważniejsze ograniczenia testu CAS i w jaki sposób skład pożywki oraz pH mogą wpływać na wynik?
6. Dlaczego w analizie statystycznej dotyczącej wyników pokazanych w publikacji czwartej P4 zastosowano odrębne ANOVA zamiast modelu uwzględniającego szczep, podłoże, czas i ich interakcje?
7. Co było niezależną jednostką eksperymentalną w doświadczeniu z burakiem: nasiono czy doniczka? Ile było niezależnych doniczek w wariancie?
8. Jak sterylizacja podłoża i podnoszenie pH do 7 mogły wpłynąć na biodostępność metali oraz na interpretację wyników?
9. Jakie ryzyka biobezpieczeństwa należy rozważyć przed zastosowaniem szczepów z grupy *Bacillus cereus* w rolnictwie lub łańcuchu żywnościowym?
10. Jak Doktorantka wyjaśnia brak lub obecność zgodności między przewidywanymi genami a obserwowanym fenotypem?



Konkluzja i ocena końcowa

Rozprawa doktorska mgr inż. Natalii Rutkowskiej podejmuje aktualny, ważny i interdyscyplinarny problem dotyczący wykorzystania bakterii endofitycznych oraz ich potencjału biosyntetycznego w rozwiązaniach wspierających wzrost roślin i ograniczanie skutków zanieczyszczenia metalami. Doktorantka wykazała umiejętność planowania wieloetapowych badań, posługiwania się nowoczesnymi metodami genomowymi i bioinformatycznymi, prowadzenia doświadczeń mikrobiologicznych oraz interpretowania wyników w szerokim kontekście biotechnologicznym.

Za najważniejsze osiągnięcie naukowe uznaję zsekwencjonowanie genomu hodowlanych bakterii endofitycznych przytulii czepnej, wykazanie ich zróżnicowanego potencjału biosyntetycznego, wskazanie szczepów o wysokiej aktywności chelatującej oraz próbę powiązania predykcji genomicznych z fenotypem. Oryginalność tego osiągnięcia oceniam jako wystarczającą dla rozprawy doktorskiej.

Wskazane przeze mnie uwagi dotyczą przede wszystkim sposobu formalnego przedstawienia cyklu prac składających się na rozprawę doktorską, stopnia ostrożności w interpretacji BGC, ograniczeń testu CAS, niedostatecznej charakterystyki chemicznej produktu, statystyki doświadczeń wieloczynnikowych oraz wstępnego charakteru badań roślinnych. Uwagi językowe i redakcyjne są liczne, lecz możliwe do usunięcia i nie podważają zasadniczej wartości naukowej pracy.

Szczególnego podkreślenia wymaga, że prace P3 i P5 były w chwili oceny manuskryptami, a praca czwarta osiągnęła status publikacji dopiero w trakcie procedury. Okoliczność ta powinna zostać formalnie odnotowana i przemawia za traktowaniem rozprawy jako hybrydowej. Nie stanowi jednak, w mojej ocenie, podstawy do zakwestionowania merytorycznej całości, ponieważ pełne teksty manuskryptów zostały przedłożone do oceny, są spójne z rozprawą i dokumentują oryginalne wyniki Doktorantki.

Po uwzględnieniu mocnych stron, ograniczeń i przedstawionych zastrzeżeń oceniam rozprawę pozytywnie. Stwierdzam, że przedstawia ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, dokumentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki oraz jej zdolność do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową przeprowadzonych badań i korzyści płynące z ich potencjalnego wdrożenia, a także szeroki zakres wykonanych eksperymentów i umiejętności logicznej interpretacji wyników oraz właściwego wnioskowania stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska w pełni spełnia wymagania określone w art. 187 ust.1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2020, poz. 85 ze zm.). Wnioskuje zatem do Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie mgr inż. Natalii Rutkowskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.


prof. dr hab. inż. Agnieszka Piotrowska-Cyplik

