

Rzeszów, 25.08.2026 r.

Dr hab. inż. Tomasz Piechowiak, prof. UR
Katedra Chemii i Toksykologii Żywności
Wydział Technologiczno-Przyrodniczy
Uniwersytet Rzeszowski
Ul. Ćwiklińskiej 1A, 35-601 Rzeszów

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr inż. Natalii Rutkowskiej

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

1. Sylwetka naukowa Doktorantki

Mgr inż. Natalia Rutkowska jest absolwentką studiów I i II stopnia na kierunku Biotechnologia na Politechnice Łódzkiej oraz studiów II stopnia na kierunku Biologia na Uniwersytecie Łódzkim. Od 2022 roku jest doktorantką Interdyscyplinarnej Szkoły Doktorskiej Politechniki Łódzkiej. W trakcie kształcenia w Szkole Doktorskiej odbywała zagraniczne staże naukowe w ramach programu Erasmus+, realizowała dwa projekty badawcze oraz aktywnie uczestniczyła w pięciu krajowych konferencjach naukowych, podczas których dwukrotnie została wyróżniona. Na szczególne podkreślenie zasługuje również jej zaangażowanie w działalność organizacyjną Politechniki Łódzkiej. Wysoka aktywność naukowa i organizacyjna Doktorantki została doceniona przyznaniem Stypendium Naukowego z Własnego Funduszu Stypendialnego Politechniki Łódzkiej oraz sześciokrotnie Nagrodą Rektora za osiągnięcia wspierające doskonałość naukową. Na uznanie zasługuje również jej dorobek publikacyjny obejmujący współautorstwo sześciu publikacji, a także zaangażowanie w deponowanie genomów do bazy NCBI.

2. Ocena formalna rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska powstała pod opieką dr hab. inż. Olgi Marchut-Mikołajczyk, prof. uczelni (promotor główny) oraz dr hab. inż. Bartosza Sekuły, prof. uczelni (promotor pomocniczy) w Instytucie Biotechnologii Przemysłowej i Molekularnej na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej. Rozprawę doktorską stanowi cykl powiązanych ze sobą tematycznie pięciu prac naukowych, spośród których dwie zostały opublikowane w zagranicznych czasopismach, o uznanej renomie tj. *International Journal of Molecular Sciences*

oraz *Frontiers in Microbiology*, o sumarycznym *Impact Factor* równym 10.5 (MNiSW = 240 pkt). Pozostałe artykuły zostały złożone do czasopism (*Environmental Microbiology*, *BMC Genomics*, *Microbial Cell Factories*), lecz nie zostały jak dotąd opublikowane i są obecnie na etapie recenzji. Zgodnie z deklaracjami o udziałach merytorycznych, załączonych do każdego druku publikacji lub manuskryptu, Doktorantka była pierwszym autorem tych prac i pełniła w nich wiodącą rolę. Udział Doktorantki w powstanie artykułów był na ogół wyższy niż 60% i obejmował m.in. przegląd i analizę literatury, opracowanie koncepcji i przeprowadzenie badań, analizę bioinformatyczną oraz przygotowanie manuskryptów.

Artykuły, które stanowią podstawę osiągnięcia zostały przedstawione w postaci 39-stronicowego opracowania, o typowej kolejności podrozdziałów tj. „Wprowadzenie i geneza pracy”, „Cel i zakres prac badawczych”, „Omówienie najważniejszych wyników”, „Wnioski końcowe i weryfikacja hipotez badawczych” oraz „Bibliografia”. Pozostałą część rozprawy tworzą: „Streszczenie”, „Abstract”, „Wykaz skrótów i oznaczeń”, „Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej” oraz „Załączniki”.

Styl pisanie rozprawy jest precyzyjny i przystępny dla szerokiego grona czytelników. Autorka wzbogaciła część wprowadzającą o schematy graficzne, zaś omówienie najważniejszych wyników uzupełniła o wykresy oraz wizualizacje przedstawiające kluczowe odkrycia, drzewa filogenetyczne i klastry, które niewątpliwie podnoszą walory komunikacyjne pracy i ułatwiają jej odbiór. W rozprawie występują jednak pewne uchybienia formalne i edytorskie, o których należy wspomnieć:

- Autorka nazywa prace P3–P5 publikacjami. Ponieważ artykuły te nie zostały jak dotąd opublikowane w czasopismach, nie należy ich określać jako „publikacje”. Ponadto uważam, że Doktorantka nie powinna wliczać IF i punktów MNiSW prac nieopublikowanych do sumy wskaźników całego dzieła.
- Odwoływanie się do poszczególnych prac badawczych i ich streszczanie w rozdziale „Wprowadzenie i geneza pracy” uważam za zbędne i zaburzające ciągłość argumentacji. Przykładowo, fragment ze str. 17: „W świetle aktualnej wiedzy, pierwsze doniesienie na temat endofitycznych bakterii przytulii czepnej stanowi publikacja „*Exploring the diversity and genomics of cultivable Bacillus-related endophytic bacteria from the medicinal plant Galium aparine L.*” (P2). Obejmuje ona izolację bakterii endofitycznych, ich identyfikację taksonomiczną oraz analizę genomów pod kątem zdolności do produkcji związków bioaktywnych” bardziej odpowiada charakterem do omówienia wyników niż do wprowadzenia.

- Zdanie na str. 24: „Jego niedobór prowadzi do zahamowania wzrostu endofity zwiększając biodostępność tego pierwiastka, poprawiając kondycję roślin (Timofeeva i in., 2022)” jest niepoprawne pod względem składniowym i logicznym.
- W tekście opracowania występuje niejednolita forma narracji. Niektóre fragmenty, szczególnie we wprowadzeniu, Autorka napisała w pierwszej osobie liczby pojedynczej, podczas gdy, w pozostałych przybrała formę bezosobową. Uważam, że forma osobowa powinna być zastosowana do części eksperymentalnej, szczególnie do omówienia wyników, gdyż lepiej podkreśliłaby ona jej wkład i odkrycia.
- O ile sformułowane cele badawcze (str. 29) dobrze odpowiadają na zidentyfikowaną we wprowadzeniu lukę w aktualnej wiedzy, o tyle treść rozdziału „Cel i zakres prac badawczych” została przedstawiona nieco chaotycznie. W mojej ocenie bardziej czytelne byłoby przedstawienie celów szczegółowych, odpowiadających im hipotez oraz zakresu prac w postaci tabeli.
- Tekst rozprawy cechuje brak ujednoliconego stylu cytacji.

Wspomniane powyżej błędy nie mają jednak istotnego wpływu na ogólną wartość merytoryczną pracy, a stanowią jedynie cenne wskazówki na przyszłość, które mogą przyczynić się do doskonalenia warsztatu naukowego i redakcyjnego Doktorantki, w jej dalszej karierze naukowej.

3. Ocena merytoryczna

W ostatnich latach obserwuje się dynamiczny wzrost liczby badań ukierunkowanych na poszukiwanie substancji i rozwiązań umożliwiających ochronę roślin przed stresem środowiskowym wywołanym przez suszę, zasolenie, wysoką temperaturę lub skażenie metalami ciężkimi. Coraz większe znaczenie zyskują w tym zakresie podejścia biotechnologiczne, w których wykorzystuje się potencjał mikroorganizmów do produkcji określonych metabolitów, które w postaci surowej lub oczyszczonej mogą wspomagać wzrost i rozwój roślin oraz zwiększać ich zdolność do przystosowania do zmieniających się warunków środowiska. W związku z tym uważam, że temat badawczy podjęty przez Doktorantkę jest trafny i doskonale wpisuje się w aktualny trend badawczy dotyczący poszukiwania alternatywnych środków ochrony roślin.

Głównym celem badawczym Doktorantki była identyfikacja i charakterystyka bakterii endofitycznych bytujących w *Galium aparine* L. oraz optymalizacja produkcji i analiza metaloforów przez wybrany szczep bakterii. Zakres prac badawczych został starannie przemyślany i konsekwentnie zaplanowany, co umożliwiło kompleksową weryfikację postawionych hipotez. Poszczególne etapy badań są ze sobą logicznie powiązane, a wyniki uzyskane na wcześniejszych etapach stanowią

podstawę do realizacji kolejnych, tworząc spójny i konsekwentny tok postępowania badawczego. Badania obejmowały: (i) identyfikację bakterii wyizolowanych z *Galium aparine* L.; (ii) analizę genomów bakterii pod kątem potencjału wytwarzania substancji bioaktywnych wspierających rośliny, w tym metaloforów; (iii) optymalizację produkcji metaloforów przez wybrany szczep o wysokim potencjale produkcyjnym (*Priestia* sp. GS2); (iv) ocenę skuteczności oddziaływania metaloforu ze szczepu *Priestia* sp. GS2 w redukcji stresu wywołanego przez metale ciężkie u *Beta vulgaris* L.

Wyniki tych badań, wraz z pełną dyskusją oraz opisem eksperymentów zostały przedstawione w pracach badawczych (P2-P5):

- P2. Rutkowska, N., Daroch, M., & Marchut-Mikołajczyk, O. (2025). Exploring the diversity and genomics of cultivable *Bacillus*-related endophytic bacteria from the medicinal plant *Galium aparine* L. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1612860. doi:10.3389/fmicb.2025.1612860.
- P3. Rutkowska, N., Drożdżyński, P., Boruta T., Sekuła. B., Marchut-Mikołajczyk, O. Bacillaceae within *Galium aparine* L.: A Plant-Associated Treasure of Biosynthetic Diversity and Growth-Promoting Potential – praca w recenzji w *Environmental Microbiology Reports*.
- P4. Rutkowska, N., Sekuła, B., Marchut-Mikołajczyk, O. Mining the *Galium aparine* L. microbiome: genome-guided discovery and experimental validation of metallophoreproducing endophytic bacteria - praca w recenzji w *BMC Genomics*.
- P5. Rutkowska, N., Sztuka, D., Sekuła, B., Marchut-Mikołajczyk, O. Optimization of production and characterization of opine metallophore from endophytic *Priestia* sp. GS2 for heavy metal chelation and plant growth promotion – praca w recenzji w *Microbial Cell Factories*.

Przeprowadzenie powyższych badań pozwoliło Autorce rozprawy na dokonanie następujących odkryć:

- *Galium aparine* L. jest rezerwuarem 10 szczepów bakterii endofitycznych, należących do rodziny Bacillaceae, w tym do rodzajów *Priestia*, *Bacillus* i *Peribacillus*. Szczepy *Priestia* sp. GS2 oraz *Bacillus* sp. GL1 reprezentują nowe gatunki bakterii.
- Genomy zidentyfikowanych bakterii zawierają geny związane z potencjalnym promowaniem wzrostu i rozwoju roślin, metabolizmem węglowodanów oraz mechanizmami adaptacji roślin do warunków stresowych, w tym geny związane z produkcją metaloforów, antybiotyków i substancji przeciwgrzybowych.
- Wyizolowane szczepy cechują się dobrą tolerancją na suszę, zasolenie i podwyższoną temperaturę, a także wykazują zdolność do produkcji amoniaku, auksyn, wiązania azotu

atmosferycznego (szczoney GR2, GS3, GL2, GS2), wytwarzania enzymów hydrolitycznych, produkcji PHA (poza GR2) oraz produkcji barwników (GR4, GS2).

- Wszystkie szczoney wykazują aktywność do produkcji sideroforów.
- Zidentyfikowane endofity cechują się zróżnicowaną zdolnością do chelatowania metali ciężkich. Szczoney GR2 ma zdolność do chelatowania Pb^{2+} , Cd^{2+} oraz Hg^{2+} .
- Oczyszczony metalofor produkowany przez szczoney *Priestia* sp. GS2 wspomaga wzrost *B. vulgaris* w glebie skażonej Co^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} oraz Hg^{2+} .

Przedstawione powyżej odkrycia należy uznać za szczególnie cenne z punktu widzenia współczesnego rolnictwa, zwłaszcza w kontekście poszukiwania naturalnych i przyjaznych środowisku metod wspomagania wzrostu roślin oraz ograniczania negatywnego wpływu stresów środowiskowych. Na szczególne uznanie zasługuje kompleksowość i nowatorski charakter badań, a także mnogość nowoczesnych technik analizy instrumentalnej. Szczególnie wartościowym osiągnięciem jest wytypowanie szczoney *Priestia* sp. GS2, optymalizacja produkcji wytwarzanego przez niego metaloforu oraz wykazanie jego korzystnego wpływu na wzrost *Beta vulgaris* L. w warunkach skażenia gleby metalami ciężkimi. Uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w rozwój wiedzy dotyczącej wykorzystania mikroorganizmów i ich metabolitów w biologicznym wspomaganiu rozwoju roślin, a jednocześnie wskazują na ich potencjał do opracowania nowych, bardziej zrównoważonych rozwiązań dla rolnictwa. Całość badań świadczy o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki, jej umiejętności prowadzenia wieloetapowych i interdyscyplinarnych badań oraz zdolności do przekładania wyników o charakterze podstawowym na potencjalne zastosowania praktyczne.

Istotnym uzupełnieniem części eksperymentalnej rozprawy stanowi artykuł przeglądowy (P1. Rutkowska, N, Drożdżyński, P., Ryngajłło, M. & Marchut-Mikołajczyk,(2023). Plants as the Extended Phenotype of Endophytes – The Actual Source of Bioactive Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), 10096. doi:10.3390/ijms241210096), w którym Doktorantka rozwija pojęcie endofitu, opisuje zależność między rośliną, a endofitami w kontekście ich pozytywnego wpływu na rozwój roślin i ich ochrony przed stresem środowiskowym, wraz z szerokim przeglądem związków bioaktywnych syntetyzowanych przez endofity grzybowe i bakteryjne.

Wszystkie artykuły wchodzące w skład rozprawy zostały napisane w sposób syntetyczny i przejrzysty, z wykorzystaniem aktualnego piśmiennictwa. Prace charakteryzują się spójną i klarowną strukturą, poprawnością metodologiczną oraz rzeczowym przedstawieniem i wnikliwą dyskusją uzyskanych wyników. Pomimo wysokiej oceny merytorycznej rozprawy, dostrzegam również pewne kwestie wymagające szerszego omówienia:

- Doktorantka pobierała materiał roślinny tylko z jednego stanowiska (51°34'02,8"N 19°11'04,6"E). W związku z tym nasuwa się pytanie, czy profil endofitów, będzie uzależniony od specyfiki stanowiska, chociażby warunków klimatyczno-glebowych?
- Potencjał endofitów do wydzielania enzymów hydrolitycznych Doktorantka określała metodą półilościową, bazująca na wizualnej ocenie degradacji substratu wprowadzonego do podłoża. Uważam, że prezentacja w pracy P3 tylko wybranych zdjęć hodowli endofitów (Figura 2) nie potwierdza danych przedstawionych w tabeli 2. Doktorantka powinna przedstawić fotografie hodowli dla wszystkich endofitów i każdej testowanej grupy enzymów hydrolitycznych.
- Doktorantka wykazała, że szczepy *Priestia* spp. (GS2, GR4) wykazują podobieństwo sekwencji genomowych do *Halobacillus halophilus* DSM 2266, który jest zdolny do wytwarzania karotenoidów. W mojej ocenie zastosowane podejście do oceny zdolności badanych szczepów do produkcji barwników było jednak niewystarczające. Doktorantka zastosowała wyłącznie metanol do ekstrakcji karotenoidów, który w ograniczonym stopniu jest zdolny do izolacji tej grupy substancji. Do maksymalnej ekstrakcji karotenoidów zasadne byłoby zastosowanie rozpuszczalników o mniejszej polarności, np. heksanu, chloroformu lub chlorku metylenu. W związku z tym samo poszukiwanie maksimum absorpcji charakterystycznego dla karotenoidów w widmach UV-Vis ekstraktów metanolowych należy uznać za niewystarczające do jednoznacznego potwierdzenia ich obecności. Ponadto, uważam, że zarówno zdolność do wytwarzania karotenoidów, obecność prekursorów tych substancji oraz kwasu pulcherminowego przez *Bacillus wiedmanii* powinna być potwierdzona chromatograficznie.
- Dlaczego Autorka zdecydowała się wykorzystać do projektowania eksperymentu optymalizacyjnego i analizy wyników metodę Taguchiego. Z reguły do optymalizacji warunków procesu za pomocą narzędzi statystycznych wykorzystuje się metodę powierzchni odpowiedzi. Czy zdaniem Autorki, zastosowanie metody Taguchiego pozwala na bardziej efektywne określenie optymalnych warunków procesu?
- Autorka dowiodła, że wprowadzenie oczyszczonego metaloforu ze szczepu GS2 redukuje toksyczność u *Beta vulgaris* L. określonych jonów metali ciężkich wprowadzonych do gleby, co było manifestowane przez większą zdolność do kiełkowania, większy przyrost biomasy oraz długość korzenia i łodygi. W mojej ocenie badania te należałoby rozszerzyć o analizę akumulacji w roślinie dodawanych do podłoża jonów metali, a mechanizm redukcji stresu określić przez pomiar markerów stresu abiotycznego, np. ekspresję genów i białek

antyoksydacyjnych, stopień uszkodzeń oksydacyjnych lub poziom generacji reaktywnych form tlenu.

Na tym etapie pragnę podkreślić, że zgłoszone uwagi mają przede wszystkim charakter metodologiczny i dotyczą kwestii, które mogłyby zostać w pracy doprecyzowane. Nie wpływają one jednak w istotny sposób na jej ogólny odbiór, ani znacząco na wartość merytoryczną. Praca pozostaje spójna i logiczna, a przedstawione wyniki zachowują swoją wiarygodność oraz znaczenie. Uwagi te należy zatem traktować przede wszystkim jako sugestie, które mogą być pomocne w przyszłości, zwłaszcza jeśli Doktorantka zdecyduje się kontynuować badania w podobnym obszarze w ramach dalszej kariery naukowej.

4. Podsumowanie i wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Natalii Rutkowskiej stanowi oryginalne i wartościowe opracowanie naukowe, które wnosi istotny wkład w poszerzenie krajowej i międzynarodowej wiedzy dotyczącej poszukiwania alternatywnych źródeł substancji wspomagających rozwój roślin w warunkach stresu środowiskowego, w szczególności stresu indukowanego obecnością metali ciężkich. Pomimo zgłoszonych uwag, odnoszących się przede wszystkim do kwestii edytorskich i metodologicznych, należy podkreślić, że przeprowadzone przez Doktorantkę badania cechują się wysoką wartością poznawczą oraz znacznym potencjałem aplikacyjnym.

W świetle powyższego stwierdzam, że rozprawa doktorska pt. „Bakterie endofityczne *Galium aparine* L. – analiza biosyntetycznych klastrów genów i ich znaczenie w produkcji związków bioaktywnych” spełnia wszystkie wymagania formalne przedstawione w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). Wnioskuje zatem o dopuszczenie mgr inż. Natalii Rutkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Tomasz Prochowiec