AUTOREFERAT PRZEDSTAWIAJĄCY OPIS DOROBKU I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH

dr inż. Sebastian Wojciech Przemieniecki
Katedra Entomologii i Fitopatologii
Wydział Rolnictwa i Leśnictwa
Uniwersytet Warmińsko – Mazurski w Olsztynie

Olsztyn 2026

1. Imię i nazwisko

Sebastian Przemieniecki

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

2017 Uzyskanie stopnia naukowego doktora nauk rolniczych w zakresie rolnictwa i ogrodnictwa o specjalności - ochrona roślin, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa (aktualnie: Wydział Rolnictwa i Leśnictwa); tytuł pracy doktorskiej: „Środki ochrony roślin i bakterie antagonistyczne w relacji z różnymi grupami genetycznymi i fenotypowymi *Pectobacterium* spp.", Promotor: prof. dr hab. Tomasz Kurowski, Promotor pomocniczy: prof. dr hab. Monika Harnisz, Recenzenci: prof. dr hab. Henryk Pospieszny, dr hab. Grzegorz Lemańczyk, prof. PBŚ.

2011 Uzyskanie dyplomu magistra Ochrony Środowiska, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, tytuł pracy: „Badanie zmienności genetycznej *Fusarium avenaceum*", Promotor: prof. dr hab. Tomasz Kulik.

2010 Uzyskanie dyplomu specjalisty z zakresu Społecznie Odpowiedzialnego Biznesu, Wyższa Szkoła Pedagogiczna Towarzystwa Wiedzy Powszechnej w Warszawie (studia podyplomowe).

2009 Uzyskanie dyplomu inżyniera Ochrony Środowiska, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Ochrony Środowiska i Rybactwa (aktualnie: Wydział Geoinżynierii), tytuł pracy: „Elementy mutagenezy chemicznej u bakterii", Promotor: dr Karol Korzekwa.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

od 2019 Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Rolnictwa i Leśnictwa, Katedra Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej (aktualnie Katedra Entomologii i Fitopatologii) – adiunkt

2017.10-2019.09 Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Katedra Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej – specjalista

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

4.1. Tytuły osiągnięć naukowych

Osiągnięcie 1. „Wpływ nanocząstek metali i ich molekularnych form na strukturę oraz potencjał funkcjonalny mikrobioty strefy korzeniowej i gleby"

Osiągnięcie 2. „Zmiany w strukturze mikrobioty funkcjonalnej ryzosfery i gleby pod wpływem czynników biotycznych oraz organicznych dodatków doglebowych"

4.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięć naukowych

Osiągnięcie 1. Wpływ nanocząstek metali i ich molekularnych form na strukturę oraz potencjał funkcjonalny mikrobioty strefy korzeniowej i gleby*

Suma punktów MEiN: 610, sumaryczny IF: 19,814 (bez uwzględnienia wycofanego z listy JCR czasopisma International Journal of Environmental Research and Public Health), liczba cytowań Web of Science: 34, Scopus: 42

P1. Gorczyca A., **Przemieniecki S.W.**, Kurowski T., Oćwieja M. 2018. Early plant growth and bacterial community in rhizoplane of wheat and flax exposed to silver and titanium dioxide nanoparticles. Environmental Science and Pollution Research. 25(33):33820-33826. https://doi.org/10.1007/s11356-018-3346-7.
Pkt. MEiN2018 = 30, IF = 2,914, liczba cytowań WoS: 15, Scopus: 17

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współopracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczenia, wykonaniu prac laboratoryjnych, analizie i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, napisaniu wstępnej i końcowej wersji pracy, współudziale w przygotowaniu pracy do druku. Mój udział szacuję na 60%.

P5. **Przemieniecki S.W.**, Oćwieja M., Ciesielski S., Halecki W., Matras E., Gorczyca A. 2022. Chemical structure of stabilizing layers of negatively charged silver nanoparticles as an effector of shifts in soil bacterial microbiome under short-term exposure. International Journal of Environmental Research and Public Health 19(21):14438. https://doi.org/10.3390/ijerph192114438
Pkt. MEiN2022 = 140, IF = 0 (4,614)a, liczba cytowań WoS: 11, Scopus: 14; a — ostatnia wartość IF sprzed wycofania czasopisma z listy JCR (wartość niebrana pod uwagę w obliczeniach bibliometrycznych).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w zaplanowaniu doświadczenia, wykonaniu prac laboratoryjnych, analizie i interpretacji wyników, przeprowadzeniu dyskusji, sformułowaniu wniosków, współudziale w przygotowaniu pracy do druku i korespondencji z recenzentami pracy. Mój udział szacuję na 70%.

P6. **Przemieniecki S.W.**, Ruraż K., Kosewska O., Oćwieja M., Gorczyca A. 2024. The impact of various forms of silver nanoparticles on the rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum* L.) - Shifts in microbiome structure and predicted microbial metabolic functions. Science of the Total Environment 914: 169824. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.169824.
Pkt. MEiN2024 = 200, IF = 9,8, liczba cytowań WoS: 7, Scopus: 9

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współopracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczenia, wykonaniu prac laboratoryjnych, analizie i interpretacji wyników, napisaniu wstępnej i końcowej wersji pracy, przeprowadzeniu dyskusji, sformułowaniu wniosków oraz w przygotowaniu pracy do druku i korespondencji z recenzentami pracy. Mój udział szacuję na 60%.

P7. Gorczyca A., **Przemieniecki S.W.**, Oćwieja M. 2024. Comparative effect of silver nanoparticles on maize rhizoplane microbiome in initial phase of plants growth. International Agrophysics 38(2):155-164. DOI: 10.31545/intagr/184863.
Pkt. MEiN2024 = 100, IF = 2,2, liczba cytowań WoS: 1, Scopus: 2

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współopracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczenia, wykonaniu prac laboratoryjnych, analizie i interpretacji wyników, napisaniu wstępnej i końcowej wersji pracy, przeprowadzeniu dyskusji, sformułowaniu wniosków, współudziale w przygotowaniu pracy do druku. Mój udział szacuję na 50%.

P9. **Przemieniecki S.W.**, Damszel M., Kosewska O. 2025. The impact of nanoparticles and molecular forms of TiO_2 on the rhizosphere of plants in the example of common wheat (*Triticum aestivum* L.)—shifts in microbiome structure and predicted microbial metabolic functions. International Journal of Molecular Sciences 26(2):685 DOI: 10.3390/ijms26020685.
Pkt. MEiN2024 = 140, IF = 4,9, liczba cytowań WoS: 0, Scopus: 0

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w zaplanowaniu doświadczenia, wykonaniu części prac laboratoryjnych, współudziale w analizie i interpretacji części wyników, współudziale w przeprowadzeniu dyskusji, sformułowaniu części wniosków, współudziale w przygotowaniu pracy do druku i korespondencji z recenzentami pracy. Mój udział szacuję na 90%.

Osiągnięcie 2. Zmiany w strukturze mikrobioty funkcjonalnej ryzosfery i gleby pod wpływem czynników biotycznych oraz organicznych dodatków doglebowych*

Suma punktów MEiN: 520, sumaryczny IF: 19,027, liczba cytowań Web of Science: 45, Scopus: 51

P2. **Przemieniecki, S.W.**, Damszel, M., Ciesielski, S., Kubiak, K., Mastalerz, J., Sierota, Z., Gorczyca, A., 2021. Bacterial microbiome in *Armillaria ostoyae* rhizomorphs inhabiting the root zone during progressively dying Scots pine. Applied Soil Ecology 164, 103929. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103929.
Pkt. MEiN2021 = 140, IF = 5,509, liczba cytowań WoS: 14, Scopus: 17

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współopracowaniu koncepcji badań, wykonaniu prac laboratoryjnych, analizie i interpretacji wyników, napisaniu wstępnej

i końcowej wersji pracy, przeprowadzeniu dyskusji i korespondencji z recenzentami pracy. Mój udział szacuję na 45%.

P3. **Przemieniecki S.W.**, Kosewska A., Purwin C., Zapałowska A., Mastalerz J., Kotlarz K., Kolaczek K. 2021. Biometric, chemical, and microbiological evaluation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings fertilized with mealworm (*Tenebrio molitor* L.) larvae meal. Applied Soil Ecology 167, 104037. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104037
Pkt. MEiN2021 = 140, IF = 5,509, liczba cytowań WoS: 16, Scopus: 17

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współopracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczenia, wykonaniu prac laboratoryjnych, analizie i interpretacji wyników, napisaniu wstępnej i końcowej wersji pracy, przeprowadzeniu dyskusji, sformułowaniu wniosków, współudziale w przygotowaniu pracy do druku i korespondencji z recenzentami pracy. Mój udział szacuję na 65%.

P4. **Przemieniecki, S.W.**, Skwiercz, A., Damszel, M., Telesiński, A., Zapałowska, A., Sierota, Z., Gorczyca A. 2021. Ecology, biology and enzymatic activity of the rhizosphere planted with *Larix decidua* seedlings after addition of vermicompost. Applied Soil Ecology, 168, 104101. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104101
Pkt. MEiN2021 = 140, IF = 5,509, liczba cytowań WoS: 15, Scopus: 17

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w zaplanowaniu doświadczenia, wykonaniu części prac laboratoryjnych, współudziale w analizie i interpretacji części wyników, współudziale w przeprowadzeniu dyskusji, sformułowaniu części wniosków, współudziale w przygotowaniu pracy do druku i korespondencji z recenzentami pracy. Mój udział szacuję na 70%.

P8. **Przemieniecki S.W.**, Damszel M., Kosewska O., Porzuc B., Wiśniewska K. Borsuk-Stanulewicz M., Kosewska A. 2024. The effect of frass and vermicompost fertilization on the biometrical parameters of plant, soil quality and rhizobiome on the example of red beet (*Beta vulgaris* L.) cultivation. Applied Sciences. 2024, 14, 5539. DOI: 10.3390/app14135539.
Pkt. MEiN2024 = 100, IF = 2.5, liczba cytowań WoS: 0, Scopus: 0

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współopracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczenia, wykonaniu prac laboratoryjnych, analizie i interpretacji wyników, napisaniu wstępnej i końcowej wersji pracy, przeprowadzeniu dyskusji, sformułowaniu wniosków, współudziale w przygotowaniu pracy do druku i korespondencji z recenzentami pracy. Mój udział szacuję na 45%.

[*] *Kolejność artykułów naukowych wg. daty publikacji bez uwzględnienia podziału na osiągnięcia naukowe. Kopie publikacji stanowiących osiągnięcia naukowe wraz z kopiami oświadczeń współautorów prac, określających ich indywidualny wkład w powstanie publikacji, znajdują się w załączniku 5.*

4.3. Merytoryczne omówienie osiągnięć naukowych

Wprowadzenie

Jakość komponentów agroekosystemu, w którym rozwija się roślina decyduje o jej stanie i plonie. W skali kontynentalnej jest to klimat oraz ukształtowanie terenu i to one będą decydowały o składzie gatunkowym szaty roślinnej i strukturze gatunkowej roślin uprawnych. W skali lokalnej do czynników decydujących o wzroście roślin należą m.in. warunki atmosferyczne, pora roku, dostępność wody, zasobność gleby w składniki pokarmowe, liczebność i bioróżnorodność fauny oraz flory pożytecznej, a także szkodników. Dane literaturowe wyjaśniają w pewnym stopniu zależności pomiędzy rośliną, sposobem gospodarowania terenu, a chemizmem środowiska glebowego. Niestety, liczba czynników, które oddziałują na ekosystem w skali kontynentów, krajów, regionów geograficznych, a często też danego stanowiska jest tak duża, że określenie przyszłych losów danej fitocenozy po wprowadzeniu dodatkowego czynnika jest trudna, a czasami niemożliwa. Należy pamiętać, że każdy czynnik dodatkowo wprowadzony przez człowieka przyczynia się do zmiany mikrobioty związanej ze środowiskiem glebowym i rośliną (Sporbert i inni 2021). W przypadku mikroorganizmów bardzo ważne jest dbanie o stan środowiska, a w nim o jakość gleby, co w rezultacie zwiększy ich bioróżnorodność i zasobność w mikroorganizmy pożyteczne. Niektóre zabiegi powodują zwiększenie nasilenia mikrobioty niepożądanej, czyli patogenów roślin, ale też mikroorganizmów odpowiedzialnych za zmniejszenie dostępności składników odżywczych dla rośliny.

W skali rośliny (*sensu stricto*), oprócz oddziaływania czynników na fyllosferę, to w strefie korzeniowej, tj. ryzosferze i ryzoplanie, zachodzą zjawiska decydujące o sukcesie wegetacji i plonowaniu. Według literatury (Mendes i Raaijmakers 2015; Sun i inni 2023) przykorzeniowa część rośliny jest porównywana z jelitem organizmów stałocieplnych i owadów, ponieważ to od niej zależy kształtowanie się odporności rośliny na czynniki zewnętrzne oraz na formowanie się zespołów mikro i makroorganizmów symbiotycznych oraz funkcjonalnych. To od mikroorganizmów strefy korzeniowej oraz jakości gleby, zależy kierunek obiegu pierwiastków i sukces przyswajania makro i mikroelementów przez roślinę oraz jej ochrona przed fitopatogenami i szkodnikami glebowymi.

Do dobrze poznanych mikroorganizmów pożytecznych zasiedlających glebę i ryzosferę należą m.in. bakterie rodzaju: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Enterobacter, Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Pantoea* i *Serratia* (Bhat i inni 2022) i grzyby rodzaju: *Trichoderma* spp., *Gliocladium virens*, *Penicillium digitatum*, *Aspergillus flavus*, *Actinomucor elegans*, *Podospora bulbillosa* (Adedayo i Babalola 2023).

Aby produkcja roślinna była w pełni wydajna, tworzące się glebowe i ryzosferowe zespoły mikroorganizmów muszą pełnić funkcje obronne wobec rośliny i ułatwiać dostęp korzeniom do składników pokarmowych. W środowisku glebowym przebiega wiele procesów związanych z transformacją związków organicznych i nieorganicznych. Do mikrobiologicznych procesów pożądanych dla wzrostu roślin należą m.in.: mineralizacja i humifikacja związków organicznych, wiązanie azotu cząsteczkowego, enzymatyczne i nieenzymatyczne przekształcanie związków fosforu oraz produkcja fitohormonów, sideroforów, związków fungistatycznych i naturalnych antybiotyków. Wyżej wymienione, przykładowe cechy promujące wzrost roślin i chroniące roślinę przed patogenami roślin pośrednio decydują o odporności roślin na czynniki abiotyczne, zdrowotności roślin i ich plonie (Ling i inni 2022). Zarówno w agroekosystemie, jak i ekosystemie leśnym, bardzo trudnym i zarazem ważnym aspektem jest kreowanie się zespołów mikroorganizmów przeprowadzających w odpowiedni sposób obieg pierwiastków. Głównym problemem jest obieg azotu, ponieważ bardzo dużo mikroorganizmów obecnych w środowisku glebowym przekształca go w formy, które ulatniają się do atmosfery. Ze względu na to, że część taksonów mikroorganizmów funkcjonalnych jest niemożliwa do hodowli w warunkach laboratoryjnych, stwierdzenie procesów aktualnie zachodzących w glebie jest trudne i kosztowne. Alternatywnym rozwiązaniem jest tutaj zastosowanie metod biologii

molekularnej, które mogą precyzyjnie określić liczebność bakterii funkcjonalnych, a także określić skład taksonomiczny mikrobioty bezpośrednio z próbki gleby, ryzosfery czy rośliny.

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu czynników abiotycznych i biotycznych oraz dodatków doglebowych na strukturę metataksonomiczną i funkcjonalną mikrobioty strefy korzeniowej oraz gleby. Szczególną uwagę poświęcono ocenie efektów oddziaływania preparatów nanotechnologicznych, czynników biologicznych i użyźniaczy na mikrobiom glebowy i ryzosferyczny, a także ich potencjalnemu wpływowi na stan fizjologiczny i rozwój roślin wywołany rearanżacją struktury mikrobiomu. Badania koncentrowały się na agroekosystemach oraz roślinach i glebach związanych z roślinami uprawnymi, uwzględniając również powiązania z innymi typami siedlisk związanych z produkcją roślinną.

Metody badań

Do najważniejszych metod badawczych wykorzystanych w przedstawionych osiągnięciach należały:

- Przygotowanie doświadczenia

W przypadku prac stanowiących osiągnięcie naukowe, dotyczących roślin uprawnych, wykonano testowanie doglebowe środków w teście wazonowym. W badaniach dotyczących nanocząstek i frasu owadziego, podłoże przesiano przez sito o grubości 2 mm, a następnie doprowadzono do wilgotności 60% maksymalnej pojemności wodnej i napełniono doniczki po 2 kg gleby na doniczkę. Siew roślin wykonano ręcznie, umieszczano po 6 ziaren na doniczkę na głębokość 2 cm. Doświadczenie prowadzono w komorze klimatycznej (fitotronie), analogicznie jak w poprzednich badaniach, przez 30 dni w 5 powtórzeniach (5 doniczek na wariant). Siewki pozostawiono do wzrostu w fitotronie w kontrolowanych warunkach, w temperaturze 22°C w dzień i 18°C w nocy, 12-godzinnym fotoperiodzie przy natężeniu światła 220 µmol fotonów $m^{-2} \cdot s^{-1}$ PPFD i 80% RH. Po inkubacji gleby pobrano próbki i przystąpiono bezpośrednio do analiz. Po wegetacji roślin wyjęto rośliny i system korzeniowy z doniczek, ręcznie usunięto masową glebę, a następnie zebrano przylegającą ryzosferę w sterylnych warunkach za pomocą noża. W pracy dotyczącej wpływu frasu owadziego na wzrost i mikrobiotę buraka ćwikłowego wykorzystano minipoletka o powierzchni $1 m^2$.

W przypadku badań z wpływem wermikompostu na modrzew europejski zastosowano wkopane w ziemię, półprzepuszczalne wazony z 50 L podłoża z terenu leśnego, przesianego przez sito 2 mm. Rośliny były pobrane do analizy po 2 latach wegetacji. W badaniach dotyczących *Armillaria ostoyae* pasożytujących na sośnie zwyczajnej (Nadleśnictwo Nowe Ramuki), porażone fragmenty korzeni przerośnięte ryzomorfami pobrano ręcznie i po dostarczeniu do laboratorium przystąpiono do analiz.

- Analiza chemiczna gleby

Glebę przeznaczoną do badań zaliczono do gleby płowej, wytworzonej z gliny zwałowej lekkiej pylastej, którą zakwalifikowano do klasy bonitacyjnej IIIb-IVa. W glebie oznaczono pH w KCl o stężeniu 1 mol dm^3 metodą potencjometryczną. Magnez oznaczono metodą Schachtschabela polegającą na jego ekstrakcji z gleby roztworem 0,0125M $CaCl_2$ przy stosunku gleby do roztworu wynoszącym 1:10. Zawartość fosforu i potasu oznaczono za pomocą zbuforowanego roztworu mleczanu wapnia i kwasu mlekowego o pH 3,55 metodą Egnera-Riehma. Zawartość azotu ogółem oznaczono metodą Kjeldahla, całkowitą zawartość węgla organicznego metodą Tiurina. Jako utleniacz węgla organicznego zastosowano mieszaninę dwuchromianu potasu i stężonego kwasu siarkowego ($K_2Cr_2O_7$ + H_2SO_4). Utlenianie nastąpiło w obecności katalizatora (siarczan srebra), z podgrzewaniem zewnętrznym przez 5 minut. Jako reduktor nadmiaru utleniacza zastosowano 0,1M roztwór soli Mohra ($FeSO_4/NH_4/2SO_4 \cdot 6H_2O$). Wszystkie metody analityczne opisano w normach międzynarodowych AOAC International (https://www.aoac.org).

- Analizy biometryczne roślin

W badaniach, w których określono parametry biometryczne roślin wykonywano ocenę długości części roślin na podstawie wykonanych zdjęć, przy użyciu programu ImageJ. Pomiar masy próbek wykonano za pomocą wagi analitycznej (Radwag). Pośredni pomiar zawartości chlorofilu (SPAD) wykonano przenośnym fotometrem (Konika Minolta).

- Analiza potencjału fizjologicznego mikrobioty zasiedlającej próbki

W celu półilościowego oznaczenia potencjalnej aktywności biochemicznej i metabolicznej zastosowano testy API (Biomerieux). Kluczowym etapem była nocna preinkubacja próbek w wodzie peptonowej z dodatkiem pierwiastków śladowych w celu zapewnienia aktywności różnych grup mikroorganizmów. Następnie prehodowle doprowadzano do odpowiedniej gęstości optycznej (0,1 dla testowania źródeł węgla i 0,5

dla testów biochemicznych), po czym uzupełniano zestawy testowe zgodnie z dołączoną instrukcją i inkubowano 24 h. Hodowle właściwe jak i prehodowle były inkubowane w 28ºC.

- Izolacja materiału genetycznego

Próbki gleby i roślin poddano homogenizacji kulkami szklanymi w homogenizatorze TissueLyser LT (Qiagen). Następnie z otrzymanych lizatów izolowano DNA przy pomocy zestawu GeneMATRIX Soil DNA Purification Kit (EURx) lub równoważnego stosując się do instrukcji dołączonej do zestawu. Po izolacji wykonano pomiar ilości (fluorymetr Quantus) i jakości otrzymanego materiału genetycznego (Spektrofotometr Nanodrop 2000c).

- Real Time PCR i detekcja genów funkcjonalnych

W tabeli zamieszczono parametry dla reakcji qPCR i PCR dla poszczególnych oznaczeń.

Cel oznaczenia	**Startery i sondy***	**Warunki reakcji**	**Bibliografia**
Ładunek bakterii	BAC338F BAC805R BAC516F (probe)	Wstępna denaturacja w 95°C przez 10 min; 42 cykle w 95°C przez 15 s i 60°C przez 1 min.	Yu i inni (2005) Hemkemeyer i inni (2015)
Clostridium spp.	CI-F1 CI-R2 Probe-I (probe)	Wstępna denaturacja w 95°C przez 10 min; 45 cykli w 95°C przez 20 s, w 63°C przez 30 s i w 72°C przez 45 s.	Song i inni (2004)
Pseudomonadaceae	B2BF B2BR3	Wstępna denaturacja w 95°C przez 30 s; 40 cykli: denaturacja 5 s w 95°C, 34 s w 60°C.	Hu i inni (2016)
Ładunek grzybów	NSI1 58A2R	Wstępna denaturacja w 95°C przez 10 min; 42 cykle: w 95°C przez 15 s, 52°C przez 30 s, 72°C przez 30 s i pomiar fluorescencji w 78°C przez 15 s.	Martin and Rygiewicz (2005) Hemkemeyer i inni (2015)
Bacillus spp.	16SBACF 16SBACR	Wstępna denaturacja w 95°C przez 10 min; 45 cykli w 95°C przez 15 s, 58°C przez 55 s i 72°C przez 30 s.	Mora i inni (2011)
Toksynotwórcze *Fusarium* spp.	Tox5-1 Tox5-2	Wstępna denaturacja w 95°C przez 10 min; 45 cykli w 95°C przez 10 s, 63°C przez 10 s i 72°C przez 30 s.	Schnerr i inni (2001)
Toksynotwórcze: *Penicillium* spp. i *Aspergillus* spp. (multiplex)	ITS1 ITS2 ITSP (probe) ASPI ASPII ASPP (probe)	Wstępna denaturacja w 95°C przez 10 min; 45 cykli w 95°C przez 20 s, 70°C przez 60 s.	Suanthie i inni (2009)
Nierybosomowe syntetazy peptydowe / Syntetazy poliketydowe typu I (Actinomycetes) PPKS-I /NRPS (multiplex)	K1F M6R A3F A7R	Wstępna denaturacja przez 5 min w 95°C; 35 cykli 30 s w 95°C, 2 min w 58°C i 4 min w 72°C. Końcowa elongacja: 72°C przez 10 min.	Ayuso-Sacido and Genilloud (2005)
Fengycin (*Bacillus* spp.) *fenD*	FENDF FENDR	Wstępna denaturacja w 95°C przez 4 min, 40 cykli w 94°C przez 1 min, 58°C przez 1 min, i 72°C przez 1 min. Końcowa elongacja: 72°C przez 3 min.	Mora i inni (2011)
Surfactin (*Bacillus* spp.) *srfAA*	SRFAF SRFAR		
Bacylisin (*Bacillus* spp.) *bacA*	BACF BACR		

Iturin (*Bacillus* spp.) *ituC*	ITUCF ITUCR		
Bacyllomicin (*Bacillus* spp.) *bmyB*	BMYBF BMYMR	Wstępna denaturacja w 95°C przez 4 min, 40 cykli w 94°C przez 1 min, 55°C przez 1 min, i 72°C przez 1 min. Końcowa elongacja: 72°C przez 3 min.	
2,4-DAPG (*Pseudomonas* spp.) *phlD*	B2BF BPR4	Wstępna denaturacja w 94°C przez 3 min, 35 cykli w 94°C przez 30 s, 60°C przez 30 s, i 72°C przez 1 min. Końcowa elongacja: 72°C przez 10 min.	McSpadden Gardener i inni (2001)
Cyjanowodór (*Pseudomonas* spp.) *hcnAB*	PM2 PM726R	Wstępna denaturacja w 94°C przez 2 min, 35 cykli w 94°C przez 30 s, 67°C przez 30 s, i 72°C przez 1 min. Końcowa elongacja: 72°C przez 10 min.	Svercel i inni (2007)
Monooksygenaza amonowa (*amoA*)	amoA-1F amoA-2R	Wstępna denaturacja w 95°C przez 10 min, 40 cykli w 95 °C przez 30s, 55 °C przez 30s,72ºC przez 45 s.	Rotthauwe i inni 1997
Reduktaza nitrogenazy (*nifH*)	nifH-F nifH-Rb	Wstępna denaturacja w 95 °C przez 10 min i 40 cykli: w 95°C przez 15 s, w 60°C przez 30 s i 72°C przez 40 s.	Rösch and Bothe 2005
Reduktaza azotynów (*nirS*)	nirS cd3AF nirS R3cd	Wstępna denaturacja w 95 °C przez 10 min i 40 cykli: w 95°C przez 15 s, w 58°C przez 30 s, 72°C przez 40 s.	Michotey i inni 2000, Throbäck i inni 2004
Reduktaza tlenku diazotu (*nosZ*)	nosZ-F nosZ-R	Wstępna denaturacja w 95 °C przez 10 min i 40 cykli: w 95°C przez 15 s, w 62°C przez 30 s, 72°C przez 40 s.	Throbäck i inni 2004
Ureaza (*ureC*)	ureC1F ureC2R	Wstępna denaturacja w 95 °C przez 10 min i 40 cykli: w 95°C przez 15 s, w 60°C przez 1 min, 72°C przez 2 min.	Koper i inni 2004

*Do tworzenia krzywych standardowych użyto amplikony charakterystyczne dla danego genu wbudowane w plazmidy: Invitrogen™ TOPO™ TA Cloning™ Kit, Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, USA; we wszystkich reakcjach qPCR opartych na technologii SybrGreen wykonano krzywą topnienia produktów.

- Sekwencjonowanie Nowej Generacji (NGS)

W pracach opisujących zależności metataksonomiczne, zbiorowiska drobnoustrojów identyfikowano za pomocą sekwencjonowania regionu V3-V4 genu 16S rRNA. Fragment genu 16S rRNA amplifikowano starterami PCR zalecanymi do metody Illumina. Startery zaprojektowano poprzez dodanie wystających sekwencji nukleotydowych adaptera Illumina do starterów PCR dostarczonych przez Klindwortha i in. (2013). Amplikony indeksowano przy użyciu zestawu indeksującego Nextera® XT zgodnie z instrukcjami producenta. DNA sekwencjonowano w Illumina MiSeq w trybie 2 x 250 sparowanych końców. Wyniki sekwencjonowania zapisano w plikach FASTQ i przesłano do serwera MetaGenome Rapid Annotation Subsystems Technology (MG-RAST) w celu analizy (Meyer i in. 2008). Każdy plik przeszedł kontrolę jakości (QC), która obejmowała filtrowanie jakości (usuwanie sekwencji o więcej niż 5 niejednoznacznych parach zasad) i filtrowanie długości (usuwanie sekwencji o długości ≥2 odchyleń standardowych od średniej). W celu wyodrębnienia operacyjnych jednostek taksonomicznych, zastosowano standardowe podejście QIIME2 (ang. Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2). W najnowszych pracach zastosowano sekwencjonowanie nanoporowe przy użyciu zestawu „16S Barcoding Kit 24" w celu

metabarkodingu i wykazania różnorodności metataksonomicznej badanych próbek. Pełna analityka została udostępniona przez firmę Oxford Nanopore Technology (https://nanoporetech.com/document/rapid-sequencing-DNA-16s-barcoding-kit-v14-sqk-16114-24) i w postępowaniu laboratoryjnym nie wprowadzono istotnych, własnych modyfikacji.

Omówienie wyników badań

Osiągnięcie 1. Wpływ nanocząstek metali i ich molekularnych form na strukturę oraz potencjał funkcjonalny mikrobioty strefy korzeniowej i gleby

Pierwsze osiągnięcie obejmuje badania nad wpływem abiotycznych modulatorów środowiska glebowego, przede wszystkim nanocząstek srebra oraz nanocząstek i molekularnych form TiO_2, na strukturę i potencjał funkcjonalny mikrobioty gleby, ryzosfery i ryzoplany roślin. Badania te koncentrowały się na określeniu, w jakim stopniu właściwości fizykochemiczne cząstek wpływają na reorganizację mikrobiomu oraz na wzrost i kondycję roślin uprawnych.

W pracy dotyczącej wpływu nanocząstek metali na mikrobiotę ryzoplany roślin (**Załącznik 4; P1**) omawiano wpływ azotanu srebra ($AgNO_3$) oraz nanocząstek srebra (redukowany kwasem taninowym-AgNPs; o wielkości 16 nm) i ditlenku tytanu (TiO_2NPs1 o wielkości 207 nm i TiO_2NPs2 o wielkości 68 nm) na wzrost i zmiany liczebności mikrobioty zasiedlającej ryzoplanę siewek pszenicy zwyczajnej i lnu włóknistego. Cząsteczki i nanocząstki metali są stosowane jako substancje antybiotyczne w przemyśle i wykazują potencjał w ochronie roślin przed patogenami, dlatego podjęcie szczegółowych badań w tym zakresie jest uzasadnione (Tesser i inni 2022). Na podstawie wyników biometrii siewek stwierdzono, że azotan srebra wywiera niekorzystny wpływ na parametry wzrostu roślin. W szczególności istotnie zmniejszał zazielenienie liści w porównaniu z kontrolą, a w przypadku lnu dodatkowo ograniczał masę liści oraz zdolność kiełkowania.

Najkorzystniejsze efekty zaobserwowano po zastosowaniu nanocząstek tlenku tytanu (TiO_2NPs) u pszenicy. Wariant TiO_2NPs1 istotnie zwiększał zarówno kiełkowanie, jak i biomasę liści tej rośliny. W przypadku lnu natomiast, każda z zastosowanych nanocząstek tlenku tytanu prowadziła do zwiększenia zazielenienia liści. Warto jednak zauważyć, że wzrost masy liści u lnu występował jedynie po zastosowaniu nanocząstek srebra (AgNPs).

W przypadku mikrobioty zasiedlającej ryzoplanę wpływ azotanu srebra i nanocząstek metali różnił się w zależności od gatunku rośliny. Ładunek bakterii nie różnił się w przypadku pszenicy, natomiast istotnie zmniejszył się w stosunku do wariantu nietraktowanego po zastosowaniu $AgNO_3$ (~23%) i TiO_2NPs2 (~8%). Po zastosowaniu AgNPs i TiO_2NPs1 zaobserwowano wzrost ładunku bakterii. W przypadku ładunku pożytecznych bakterii Psaudomonas spp. zaobserwowano, że w wariancie, w którym testowano pszenicę nie wystąpiły istotne zmiany w liczebności, jedynie tendencja spadkowa po zastosowaniu $AgNO_3$. Niemniej jednak, w przypadku lnu zaobserwowano stymulujący wpływ nanocząstek srebra na liczebność tych bakterii. Ładunek pożytecznych bakterii rodzaju *Bacillus* zwiększył się po zastosowaniu TiO_2NPs2 w pszenicy, natomiast w lnie zaobserwowano powiększenie zbiorowości tych bakterii w wariancie TiO_2NPs2 i $AgNO_3$. Obecność grzybów toksynotwórczych została wykryty tylko w próbkach pszenicy. W tym przypadku każdy z użytych wariantów związków metali zmniejszył ładunek grzybów niepożądanych, jednakże AgNPs wykazywały słabsze działanie w porównaniu do reszty użytych środków.

Badania te dowiodły, że nanocząstki i związki metali, które wykazują potencjał środków ochrony roślin działają odmiennie na rośliny jednoliścienne (pszenica zwyczajna) i dwuliścienne (len włóknisty). Dowodzi to, że związki metali powinny być używane tylko na rośliny przebadane pod tym kątem, o potwierdzonym, pozytywnym działaniu na wzrost rośliny i mikrobiotę. Najważniejszym efektem tej pracy jest zaobserwowanie odmiennego działania tej samej substancji, o potencjalnym działaniu środka ochrony roślin, na mikrobiotę kolonizującą ryzoplanę roślin jednoliściennych i dwuliściennych. Idąc dalej, powstaje tutaj problem oddziaływania aplikowanych związków metali na rośliny towarzyszące zarówno w strukturze zasiewów roślin uprawnych, jak użytków zielonych, czy zadrzewień. Analiza szczegółowa wykazała, że nanocząstki są generalnie bezpieczniejsze, niż formy jonowe srebra. Nanocząstki srebra pozytywnie oddziałują na len, natomiast duże nanocząstki dwutlenku tytanu na pszenicę.

W badaniach nad wpływem różnych form srebra na bakteryjny mikrobiom glebowy (**Załącznik 4; P.5**) skoncentrowano się na analizie nagłych zmian wywołanych dodaniem czynnika, jakim były nanocząstki srebra, srebro jonowe oraz fungicyd powszechnie używany w uprawie ziemniaka. Nanocząstki metali mogą być wykorzystane w rolnictwie ale nadal jest wiele doniesień o ich niekorzystnym oddziaływaniu na organizmy żywe (Saritha i inni 2022).

Nanoczastki otrzymano za pomocą redukcji: AgNPs-TA – kwasem taninowym, AgNPs-SBTC – borowodorkiem sodu w obecności cytrynianu trisodu i AgNPs-SHSH – podfosforanem sodu w obecności heksametafosforanu sodu. Jako srebro jonowe użyto azotan (V) srebra ($AgNO_3$), natomiast komercyjny fungicyd stanowiła mieszanina substancji aktywnych: mankozebu (64%) i metalaksylu-M (3,8%). Doświadczenie przeprowadzono na glebie pochodzącej z monokultury ziemniaka (Bałcyny, województwo Warmińsko-Mazurskie), którą traktowano fungicydem, nanocząstkami srebra i srebrem jonowym w dawce 10 mg Ag lub substancji aktywnej na 100 g suchej masy gleby. Tak przygotowane próbki gleby inkubowano w szklanych zlewkach w komorze klimatycznej przez siedem dni. Po tym czasie pobrano próbki do analiz metagenomowych i qPCR. Z próbek gleby wyizolowano materiał genetyczny i poddano sekwencjonowaniu NGS dla genu 16S rRNA.

Analiza ilościowa bakteriobioty wykazała, że w porównaniu z wariantem nietraktowanym preparatami (kontrola), zastosowanie nanocząstek AgNPs-TA spowodowało istotne zwiększenie, a zastosowanie fungicydu istotne obniżenie ładunku bakterii. Pozostałe zastosowane substancje nie wywarły istotnego wpływu na liczebność bakterii w glebie. Wszystkie trzy rodzaje nanocząstek wywołały częściowo podobny efekt, tj. zwiększyły udział bakterii przetrwalnikujących: *Bacillus* spp., *Paenibacillus* spp. i *Clostridium* spp., obniżyły udział bakterii rodzaju: Nocardioides, *Arthrobacter* i Candidatus *Solibacter*, a także spowodowały wyparcie ze zbiorowości mikroorganizmów potencjalnie dobroczynnych bakterii rodzaju *Pseudomonas*. Zmiany wskaźników różnorodności mikrobioty nie różniły się znacząco, niemniej jednak każda z zastosowanych substancji zwiększyła wskaźnik bioróżnorodności. Bardziej szczegółowa analiza statystyczna wykazała, że powstały trzy grupy wywierające odmienny wpływ na strukturę taksonomiczną mikrobioty. W skład pierwszej grupy wchodziła kontrola, która była wyraźnie odmienna od pozostałych dwóch grup. W skład drugiej grupy wchodziły: AgNPs-TA, fungicyd i AgNPs-SHSH, natomiast w skład trzeciej grupy wchodziły: jony Ag^+ i AgNPs-SBTC. W porównaniu do kontroli, w drugiej grupie zaobserwowano wzrost niektórych rodzajów należących do promieniowców oraz największy ubytek bakterii pełniących istotną rolę w obiegu azotu. W trzeciej grupie zaobserwowano wzrost bakterii przetrwalnikujących, zarówno tlenowych jak i beztlenowych oraz bakterii mniej specyficznych dla środowiska glebowego.

Badając potencjał metaboliczny, zaobserwowano że wszystkie warianty różniły się od siebie, niemniej jednak zastosowanie fungicydu spowodowało drastyczne zmniejszenie aktywności zarówno enzymów hydrolitycznych jak i liczby możliwych do wykorzystania

źródeł węgla. Jedyną cechą, która uległa poprawie był potencjał wytwarzania esterazy. Zmniejszenie ogólnego potencjału metabolicznego zbiorowiska mikroorganizmów zaobserwowano też w wariancie, w którym zastosowano srebro jonowe oraz AgNPs-SBTC. Zwiększenie potencjalnej aktywności fizjologicznej zauważono w wariancie AgNPs-TA, w którym zaobserwowano zwiększenie aktywności enzymów rozkładających cukry złożone, esterazy i fosfatazę zasadową i pojawienie się aktywności lipazy. Z pracy tej wynika, że różne związki srebra są bezpieczniejsze niż użyty fungicyd, niemniej jednak także zaburzają aktywność mikrobioty glebowej. Jedynie nanocząstki redukowane kwasem taninowym oddziałują pozytywnie na cechy fizjologiczne społeczności bakterii, przy jednoczesnej, istotnej zmianie jej struktury taksonomicznej wobec kontroli. Na podstawie wyników badań zaleca się przetestowanie tego rodzaju substancji w uprawach polowych i obserwacje zależności pomiędzy plonem, zdrowotnością roślin, a mikrobiotą glebową i ryzosferową. Wykorzystanie nanocząstek określonych grup oraz ich pozytywne działanie na mikrobiotę glebową i ryzosferową zaprezentowano na konferencjach naukowych (**Załącznik 4; 7.26., 7.43. i 7.47**.), a wyniki opublikowane przez Jia i inni (2022) oraz Ahmed i inni (2023), w dużej mierze potwierdziły zależności zaobserwowane na tym etapie prac badawczych, co pomogło ukierunkować zaprojektowanie dalszych badań przedstawione w niniejszym opracowaniu. Ponadto publikacja naukowa P5 jest rezultatem stażu naukowego w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN zrealizowanego w dniach 21.06-6.09.2021, a wyniki badań zostały osiągnięte dzięki Opiekunowi Naukowemu Stażu, dr hab. Magdaleny Oćwieji, prof. IKiFP PAN (**Załącznik 6**).

Dalszym etapem było przetestowanie badanych nanocząstek na roślinę i kształtowanie się struktury ryzobiomu. W badaniach „The impact of various forms of silver nanoparticles on the rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum* L.) - Shifts in microbiome structure and predicted microbial metabolic functions". (**Załącznik 4; P6**) wykorzystano wcześniej użyte formy nanocząteк srebra o różnych wielkościach i ładunkach powierzchniowych na prokariotyczny i eukariotyczny ryzobiom oraz parametry wzrostu pszenicy jarej. W celach porównawczych zastosowano również komercyjny fungicyd zawierający strobilurynę oraz azotan srebra ($AgNO_3$). Na podstawie uzyskanych wyników wyodrębniono trzy charakterystyczne grupy nanocząstek, różniące się wpływem na mikrobiotę ryzosfery i właściwościami stymulującymi wzrost roślin.

Pierwszą grupę stanowiły nanocząstki o małym rozmiarze (około 10 nm) i ładunku ujemnym, a także fungicyd. Ich wpływ na skład mikrobiomu był ograniczony i zbliżony do

próby kontrolnej, w której nie zastosowano żadnego traktowania. W tej grupie nie stwierdzono istotnych zależności pomiędzy ocenianymi cechami a strukturą OTU (ang. operational taxonomic units, operacyjne jednostki taksonomiczne), a jedyną zauważalną zmianą był niewielki wzrost obecności grzyba rodzaju *Mucronella*, co może sugerować nieznaczną modyfikację biologii ryzosfery. Ogólnie jednak, wpływ tych nanocząstek oraz fungicydu był marginalny i ograniczał się do zmian w rzadkich grupach mikroorganizmów, głównie eukariotycznych.

Drugą grupę tworzyły nanocząstki o większym rozmiarze (30–60 nm) i ujemnym ładunku powierzchniowym, reprezentowane przez typy AgNPs-HH oraz AgNPs-TC. Ich działanie na mikrobiom było najbardziej korzystne z punktu widzenia wspierania wzrostu roślin. Zastosowanie tych nanocząstek prowadziło do znacznego zwiększenia liczebności bakterii wykazujących właściwości promujące wzrost roślin (PGPR), w tym bakterii wiążących azot oraz mikroorganizmów o szerokim zakresie aktywności enzymatycznej, takich jak ureaza, proteaza czy enzymy degradujące ligninę. Obserwowane zmiany przypisano m.in. obecności pożądanych bakterii z rodzaju *Pseudomonas* i *Arthrobacter*, co korelowało z najwyższymi wartościami wskaźnika NDVI, świadczącymi o dobrej kondycji roślin.

Trzecią grupę stanowiły próbki traktowane azotanem srebra oraz nanocząstkami o dodatnim ładunku i małym rozmiarze (AgNPs-CHSB). W tym przypadku zaobserwowano wzrost liczby mikroorganizmów autotroficznych, beztlenowych, bakterii denitryfikujących oraz utleniających siarkę, wodór i inne jony, co wiązało się z jednoczesnym spadkiem liczebności tlenowych bakterii chemoheterotroficznych. Takie zmiany w strukturze mikrobiomu mogą być uznane za potencjalnie niekorzystne dla warunków wspierających wzrost roślin.

Zarówno analiza metadanych, jak i obserwowane zmiany biologiczne wskazują jednoznacznie, że właściwości fizykochemiczne nanocząstek, w szczególności ich wielkość i ładunek powierzchniowy, mają istotny wpływ na aktywność mikrobiologiczną gleby w strefie ryzosfery pszenicy. Badanie wykazało, że AgNPs o większym rozmiarze i ujemnym ładunku, stosowane w niskim stężeniu (10 ppm), mogą wywoływać stymulujący efekt na korzystne cechy mikrobiomu ryzosfery. Jednocześnie potwierdzono, że niektóre typy AgNPs wywołują zmiany mikrobiologiczne zbliżone do efektu działania azotanu srebra.

Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami dotyczącymi gleb uprawianych w monokulturze ziemniaka (**Załącznik 4; P5**), w których również zostało zaobserwowane różnicowanie się struktury taksonomicznej bakteriobioty glebowej, ale w mniejszym stopniu

niż zaobserwowano w ryzosferze. Należy jednak zaznaczyć, że interakcje zachodzące pomiędzy glebą, rośliną a mikroorganizmami ryzosfery są niezwykle złożone i trudne do jednoznacznego zinterpretowania.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują na potencjał AgNPs jako narzędzia nie tylko do zwalczania szkodliwych mikroorganizmów, ale również do aktywnego wspierania rozwoju pożytecznego mikrobiomu glebowego oraz poprawy wzrostu roślin. Szczególnie obiecujące są AgNPs o większym rozmiarze i ujemnym ładunku, które mogą zostać wykorzystane w przyszłości jako innowacyjny element technologii rolniczych opartych na mikrobiologicznej poprawie żyzności gleby. Na podstawie wyników dotyczących oddziaływania nanocząstek srebra na ryzosferę roślin uprawnych odniesiono się do strategii rozmnażania mikroorganizmów, tj. strategii r i K. Określenie dążenia mikrobioty ryzosferowej do odpowiedniego zachowania reprodukcyjnego i w rezultacie metabolizmu, okazało się istotnym biomarkerem stanu ryzosfery i dalszych losów rośliny podczas wegetacji. Relacje pomiędzy wpływem wyżej opisanych AgNPs, strategią reprodukcji a rozwojem rośliny zaprezentowano na konferencji naukowej (**Załącznik 4; 7.51**).

Kolejne badania zostały przeprowadzone w metodycznie zbliżony sposób do wyżej opisanej pracy, ale przedmiotem badań była ryzoplana kukurydzy zwyczajnej „Comparative effect of silver nanoparticles on maize rhizoplane microbiome in initial phase of plants growth.” (**Załącznik 4; P7**). Zastosowanie nanocząstek srebra w początkowych fazach wzrostu kukurydzy wpłynęło na ograniczenie suchej masy roślin, szczególnie w systemie korzeniowym. Nie zaobserwowano jednak istotnego wpływu na wskaźnik NDVI (ang. Normalized Difference Vegetation Index, znormalizowany różnicowy wskaźnik wegetacji), co sugeruje, że zmiany w biomasie nie przekładają się bezpośrednio na kondycję roślin. Wszystkie testowane formy nanocząstek wykazywały podobny, umiarkowany efekt ograniczający wzrost roślin, jednakże nie powodowały radykalnych zaburzeń rozwoju.

Wpływ nanocząstek srebra na mikrobiom ryzoplany był wyraźny, lecz różnicował się pomiędzy organizmami prokariotycznymi a eukariotycznymi. Szczególnie wrażliwy okazał się mikrobiom eukariotyczny, który w badanym środowisku był liczniejszy i bardziej zróżnicowany niż mikrobiom bakteryjny. Zmiany w jego strukturze były zarówno jakościowe, jak i ilościowe, co świadczy o jego większej podatności na obecność nanocząstek srebra. W przeciwieństwie do tego, mikrobiom prokariotyczny wykazywał większą stabilność, choć także reagował na zastosowane formy nanocząstek.

Z punktu widzenia funkcjonalnego, nanocząstki srebra nie ograniczały występowania grzybów mikoryzowych, co jest istotnym wskaźnikiem bezpieczeństwa biologicznego stosowanych form. Co więcej, obserwowano wzbogacenie mikrobiomu o bakterie z typu Acidobacteriota, a w większości przypadków – z wyjątkiem formy redukowanej trójzasadowym cytrynianem sodu i stabilizowanej borohydrkiem sodu – także o pożyteczne bakterie z rodzaju Devosia.

Spośród badanych form nanocząstek, wykazano wyraźne różnice pomiędzy typem redukowanym cytrynianem sodu i stabilizowanym borohydrkiem sodu, typem redukowanym cysteaminą i stabilizowanym cytrynianem sodu, a grupą obejmującą formy redukowane z użyciem chlorowodorku hydroksyloaminy, kwasu taninowego i trójzasadowego cytrynianu sodu. Szczególnie korzystne zmiany mikrobiologiczne obserwowano w przypadku formy zredukowanej hydroksyloaminą, której działanie sprzyjało wzbogaceniu mikrobiomu ryzoplany kukurydzy o pożądane taksony mikroorganizmów.

Wyniki jednoznacznie wskazują, że efekty oddziaływania nanocząstek srebra nie są determinowane przez ich rozmiar, lecz zależą od właściwości powierzchniowych stabilizującej warstwy, w tym szczególnie od ładunku powierzchniowego. Różnice pomiędzy działaniem nanocząstek a klasycznym azotanem (V) srebra były szczególnie widoczne w odniesieniu do występowania grzybów mikoryzowych oraz bakterii z rodzaju Devosia, których obecność została znacznie silniej ograniczona przez $AgNO_3$ niż przez AgNPs.

Podsumowując, choć uwalnianie nanocząstek srebra do środowiska może potencjalnie zaburzać homeostazę glebową, to ich niskie stężenia – przy odpowiednich właściwościach powierzchniowych – mogą również wywoływać efekt hormezy, stymulując aktywność korzystnych mikroorganizmów. Badanie to podkreśla znaczenie nie tylko samej obecności nanocząstek srebra, lecz także ich strukturalnych i chemicznych właściwości w kształtowaniu mikrobiomu roślin uprawnych.

W kolejnych badaniach „The impact of nanoparticles and molecular forms of TiO2 on the rhizosphere of plants in the example of common wheat (*Triticum aestivum* L.)—shifts in microbiome structure and predicted microbial metabolic functions.” (**Załącznik 4; P9**) dotyczących nanocząstek tytanu, oprócz obserwacji rearanżacji mikrobioty ryzosferowej, poświęcono więcej uwagi mikrobiocie funkcjonalnej oraz powiązaniu otrzymanych wyników z zastosowaniem analizy połączeń (network analysis) oraz modelowaniu równań

strukturalnych. W pracy tej analizowano wpływ nanocząstek (średniej ~70 nm i dużej wielkości >200 nm) oraz molekularnych form dwutlenku tytanu (TiO_2) na ryzosferę roślin, wykorzystując jako model badawczy pszenicę zwyczajną.

Na podstawie wyników badań zaobserwowano, że zarówno nanocząstki, jak i molekularne formy TiO_2 istotnie rearanżują strukturę ryzobiomu, a różnice te są większe niż w przypadku wyników uzyskanych z zastosowaniem nanocząstek srebra. Zauważono zmiany w strukturze bakteryjnych i grzybowych społeczności, co obejmuje zarówno ich różnorodność, jak i właściwości fizjologiczne. Oznacza to, że obecność TiO_2 w środowisku glebowym, w bliskim sąsiedztwie korzeni roślin, jest czynnikiem modyfikującym kluczowy mikrobiom ryzosfery. Średnie nanocząstki spowodowały zwiększenie jakościowe i ilościowe taksonów typowych dla strategii rozmnożeniowej r i cech heterotroficznych i odpowiedzialnych za przemiany azotu, a także zespół cech promujących wzrost roślin, tj. produkcja fitohormonów, proteaz, fosfataz, H_2S, sideroforów oraz wiązania N i CO_2. Duże nanocząstki spowodowały rozwój ryzobiomu, w którym powiększył się udział niektórych taksonów i cech metabolizmu charakterystycznego dla średnich nanocząstek, ale też mikrobioty autoroficznej i licznych taksonów grzybów.

Pod wpływem oddziaływania dużych form nanocząstek na ryzobiom zaobserwowano wzrost udziału potencjalnie pożytecznych grzybów rodzaju *Trichoderma*, natomiast molekularne formy TiO_2 wpłynęły istotnie na wzrost grupy mikroorganizmów typowych dla strategii rozmnożeniowej K i wzrost metabolizmu autotroficznego. Modelowanie równań strukturalnych ujawniło, że nanoczastki ditlenku tytanu nie wpływały na eliminację dominantów, a ich działanie dotyczyło niewielkich modyfikacji ilościowych w obrębie taksonów o dużym udziale, oraz przetasowania ilościowe lub jakościowe w wielu taksonach o niskiej liczebności. W rezultacie przełożyło się na istotną przebudowę cech metabolizmu ryzobiomu pomimo braku wyraźnej odmienności struktur mikrobioty pod wpływem użytych from ditlenku tytanu. Część powyższych obserwacji zaprezentowano również na konferencji naukowej (**Załącznik 4; 7.57**.)

Osiągnięcie 2. Zmiany w strukturze mikrobioty funkcjonalnej ryzosfery i gleby pod wpływem czynników biotycznych oraz organicznych dodatków doglebowych

Drugie osiągnięcie obejmuje badania nad wpływem czynników biotycznych oraz organicznych dodatków doglebowych na strukturę i aktywność funkcjonalną mikrobioty strefy korzeniowej i gleby. W nurcie tym analizowano zarówno reorganizację mikrobiomu

w warunkach oddziaływania patogena, jak i zmiany wywoływane przez biologicznie aktywne dodatki nawozowe, takie jak mączka z owadów, wermikompost i frass.

W pracy naukowej opisującej mechanizm współdziałania grzyba pasożytniczego z mikrobiotą podczas procesu patogenezy w strefie korzeniowej (**Załącznik 4; P2**) analizowano zmiany bakteriobiomu ryzomorf *Armillaria ostoyae* zasiedlających sosnę zwyczajną. Wstępne wyniki będące prekursorem niniejszych badań przedstawiono na konferencjach naukowych (**Załącznik 4; 7.20., 7.32.**). Próbki zostały pobrane z terenu Nadleśnictwa Nowe Ramuki (północno-wschodnia Polska) z drzew o trzech różnych stanach zamierania spowodowanych działalnością pasożyta tj.: I faza-początek degradacji, II-wyraźne objawy chorobowe, III-martwe drzewo. Z próbek ryzomorf wyizolowano materiał genetyczny i poddano sekwencjonowaniu NGS dla genu 16S rRNA. Na podstawie uzyskanych danych zaobserwowano, że następuje wyraźna rearanżacja bakteriobiomu pomiędzy pierwszą fazą a drugą, po czym w trzeciej fazie struktura taksonomiczna częściowo powraca do struktury pierwszej fazy rozwojowej choroby. Rodzajami bakterii dominującymi w każdej fazie zamierania drzewa były rodzaje *Parabacteroides* i *Clostridium*. Zaskakującym odkryciem było zaobserwowanie zmian frekwencji *Bacillus* spp., które to bardzo silnie powiększały swój udział wraz z postępem choroby (<1% w fazie I, 6% w fazie II i 14% w fazie III). Niestety nie udało się jednoznacznie odpowiedzieć, czy obecność tych bakterii była efektem obrony drzewa przed pasożytem, czy też te bakterie przetrwalnikujące były symbiontami *Armillaria ostoyae* i powiększyły swoją liczebność jako wspomaganie posożytnictwa i degradacji drewna.

Za możliwością wystąpienia *Bacillus* spp. w postaci naturalnego obrońcy drzewa stoi fakt, że bakterie te produkują szereg fungistatycznych lipopeptydów oraz chitynazę, co w połączeniu umożliwia sprawną walkę z grzybami fitopatogenicznymi (Mora i inni 2011; Veliz i inni 2017). Z kolei, za możliwością udziału w patogenezie powodowaną działalnością Armillaria ostoyae przemawia fakt produkcji przez bakterie rodzaju *Bacillus* licznych enzymów rozkładających drewno, w tym celulazę (Ma i inni 2020). Możliwe jest też, że bakterie te w postaci fakultatywnych symbiontów chronią ryzomorfy przed działaniem mikroorganizmów antagonistycznych wobec grzyba pasożytniczego. Taki układ opłaca się szczególnie, gdy pasożyt rozpoczął już degradację żywego drewna i ryzomorfy zasilone są substancjami odżywczymi.

Kolejną ważną obserwacją był wzrost bakterii wiążących azot cząsteczkowy i taksonów uczestniczących w przemianach azotu w II fazie infekcji. Zjawisko to jest

związane z niską zasobnością degradowanej tkanki drzewa oraz podłoża w azot, dlatego też rozwój bakterii mogących udostępniać azot w ryzomorfie potencjalnie pełni funkcję donora azotu dla pasożyta w zamian za proste substancje pochodzące z rozkładu drewna.

Podsumowując, zaobserwowano że mikroorganizmy potencjalnie kolonizujące glebę lub mniej prawdopodobnie ryzosferę sosny zwyczajnej mogą działać na korzyść pasożyta. Te innowacyjne wyniki badań dają nowe światło na walkę z pasożytami roślin. Odcięcie transferu odglebowego grzyba pasożytniczego od bakterii uczestniczących w patogenezie lub co bardziej prawdopodobne, od bakterii wiążących i udostępniających azot może otworzyć nową drogę w walce z groźnymi patogenami roślin.

W pracy opisującej wpływ doglebowego dodatku organicznego na mikrobiotę funkcjonalną ryzosfery pszenicy zwyczajnej (**Załącznik 4; P3**), stanowiącej część osiągnięcia, analizowano wpływ mączki z larw mącznika młynarka (*Tenebrio molitor*), alternatywnego substratu o potencjale nawozowym, na biometrię pszenicy zwyczajnej i jej mikrobiotę ryzosferową. Larwy *T. molitor* są bogate w białko o udziale aminokwasów dorównującemu mięsu wieprzowemu, a więc stanowią istotne źródło azotu dla roślin, ale też dogodne źródło żywności paszowej. Wcześniejsze badania wykazały, że larwy te są zasobne także w fosfor i potas. Trendem biogospodarki i Europejskiego Zielonego Ładu jest zmniejszenie zużycia nawozów chemicznych, a także cyrkularny obieg materii, dlatego też wykorzystanie pozostałości z produkcji owadów jest uzasadnione.

Na podstawie otrzymanych wyników badań, zaobserwowano że doglebowa aplikacja mączki owadziej spowodowała istotny wzrost składników odżywczych w glebie, takich jak: azot, zwłaszcza w formie azotu amonowego i wzrost stężenia magnezu. Po 30 dniach wzrostu siewek pszenicy zaobserwowano istotną poprawę parametrów biometrycznych w odniesieniu do kontroli, a także wzrost suchej masy i ukorzenienia się roślin w porównaniu z roślinami nawożonymi nawozem mineralnym. W przypadku mikrobioty ryzosferowej, zaobserwowano istotny wzrost ogólnego ładunku grzybów w wariancie traktowanym mączką, w odniesieniu do wariantu z nawożeniem mineralnym. Zastosowanie mączki owadziej spowodowało istotny wzrost ryzosferowych mikroorganizmów, a mianowicie: ogólnej zawartości grzybów, *Bacillus* spp., bakterii chitynolitycznych, bakterii nitryfikacyjnych i denitryfikacyjnych. Jednocześnie zaobserwowano zmniejszenie liczebności *Fusarium* spp. produkujących trichoteceny. Natomiast zastosowanie saletry amonowej spowodowało wzrost: bakterii wiążących azot (trend wzrostu) i bakterii

redukujących azotyny. Obie formy nawożenia przyczyniły się do zmniejszenia ładunku bakterii rodzaju *Pseudomonas* oraz zwiększenia ładunku bakterii wytwarzających ureazę.

Dzięki tym wynikom można zaobserwować, że obie formy nawożenia oddziałują inaczej na zjawiska zachodzące w ryzosferze pszenicy. W przypadku zastosowania mączki owadziej widać wyraźnie wzrost antagonistycznych *Bacillus* spp. (Mora i in 2011), korelujący z bakteriami chitynolitycznymi i istotnym zmniejszeniem ładunku fitopatogenicznych grzybów rodzaju *Fusarium*. Pod względem przemian azotu obserwuje się proces nitryfikacji, wynikający z działalności bakterii proteolitycznych i deaminacyjnych, ale też wzrost bakterii denitryfikacyjnych, co ostatecznie może prowadzić do strat azotu. W przypadku nawożenia mineralnego, także zaobserwowano wzrost bakterii późniejszej fazy denitryfikacji, niemniej jednak duża zasobność ryzosfery w bakterie wiążące azot cząsteczkowy ogranicza straty azotu z ryzosfery.

W aspekcie aplikacyjnym należy zwrócić uwagę, że azot z mączki jest uwalniany stopniowo, a stopień wykorzystania azotu przez roślinę jest zadowalający, a więc pomimo podwyższonego ładunku bakterii denitryfikacyjnych ich aktywność nie jest znacząca. Uzupełnieniem niniejszej pracy jest publikacja 4.B.7, opisująca procesy chemiczne powiązane z ładunkiem bakterii odpowiedzialnych za przemiany azotu w podłożu dla roślin z dodatkiem odchodów mącznika młynarka.

Celem zawartym w pracy „Ecology, biology and enzymatic activity of the rhizosphere planted with *Larix decidua* seedlings after addition of vermicompost„ było określenie wpływu dodatku wermikompostu w dawce 10 i 20% objętości gleby na ryzosferę sadzonek modrzewia po dwóch latach wzrostu (**Załącznik 4; P4**). Doświadczenie przeprowadzono w wazonach w systemie półotwartym. Dodatek wermikompostu poprawił biometrię drzew, zwłaszcza mykoryzację w porównaniu do roślin nienawożonych. Zaobserwowano silne zależności pomiędzy dawką dodawanego nawozu organicznego, a zmianami w społeczności mikroorganizmów i nicieni. Bakterie rodzaju *Bacillus*, których udział był znikomy w kontroli, w dawce 10% zwiększyły swój udział 200-krotnie, a w dawce 20% prawie 300-krotnie. Wzrost tego rodzaju bakterii był ujemnie skorelowany z liczebnością toksynotwórczych grzybów rodzaju *Penicillium* i *Fusarium* oraz nicieni pasożytniczych roślin. Wykazano, że w glebie nawożonej wermikompostem rozwinęły się gatunki *Bacillus* spp. niosące kilka genów odpowiedzialnych za produkcję lipopeptydów, tj.: fengicyny, surfaktyny, bacilisyny, ituryny i bacillomycyny. Jak już wspomniano przy opisie poprzednich publikacji stanowiących część osiągnięcia, związki lipopeptydowe

produkowane przez wiele gatunków *Bacillus* są silnymi fungistatykami o potwierdzonym działaniu przeciwko *Fusarium* spp., (Zhao i inni 2014), jednakże ich działanie na nicienie jest nieznane. Spośród innych zależności zaobserwowano, że przy 10% dawce wermikompostu zwiększył się udział bakterii mogących produkować fosfatazę alkaliczną, zwiększył się też udział dostępnego azotu azotanowego. Dawka 20% wermikompostu przyczyniła się do zwiększenia aktywności reduktazy azotanowej i kwaśnej fosfatazy, ureazy i oksydazy o-difenolowej, natomiast w glebie dominującą formą azotu był azot w formie amonowej.

Zarówno dawka 10 jak i 20 % wermikompostu wpłynęła w podobny sposób na usprawnienie mykoryzacji, rozwój bakterii antagonistycznych wobec patogenów roślin oraz na aktywność dehydrogenazy. Spowodowała ona również zwiększenie udziału grzybów niepatogenicznych w ryzosferze, co ostatecznie przyczyniło się do istotnej poprawy parametrów wzrostu fyllosfery, jak i strefy korzeniowej modrzewia.

Włączenie do badań analizy strategii reprodukcji r i K umożliwiło przeprowadzenie badań z zastosowaniem nawozów na wzrost roślin uprawnych i znacznie lepsze zrozumienie uzyskanych wyników badań. W badaniach „The Effects of Frass and Vermicompost Fertilization on the Biometrical Parameters of Plant and Soil Quality, and the Rhizobiome, in Red Beet (*Beta vulgaris* L.) Cultivation„ (**Załącznik 4, P8**) zastosowano pozostałości po produkcji owadów (frass) i wermikompost w celach porównawczych. Analizowano wpływ użytych użyźniaczy na parametry biometryczne buraka ćwikłowego (*Beta vulgaris* L.), jakość gleby oraz rhizobiom. Badanie, przeprowadzone w kontrolowanym eksperymencie mikropoletkowym, obejmowało cztery warianty nawożenia: kontrolny (bez nawozu), nawożenie mineralne, nawożenie frassem i nawożenie wermikompostem. Wyniki pokazały, że oba nawozy organiczne (frass i wermikompost) poprawiły wzrost roślin, przy czym wermikompost przyczynił się do osiągnięcia największej masy roślin. Frass i wermikompost pozytywnie wpłynęły również na aktywność enzymatyczną gleby, zwłaszcza dehydrogenaz i katalaz, oraz zwiększyły liczbę mikroorganizmów, szczególnie grzybów i promieniowców. Wermikompost okazał się skuteczniejszy w zwiększaniu zawartości węgla w glebie i poprawie jej jakości w porównaniu do frassu. Chociaż oba nawozy organiczne poprawiły wzrost roślin i zdrowie gleby, wermikompost wykazał ogólnie lepsze wyniki w stymulowaniu aktywności mikroorganizmów i obiegu składników odżywczych, ale użycie frassu skutkowało najkorzystniejszym wzrostem NH_4-N i NO_3-N w obszarze ryzosfery. W niniejszej pracy

udowodniono też, że dynamiczny rozkład materii organicznej i udostępniania składników odżywczych zależy od rearanżacji struktury bakteriobioty w stronę strategii typu r.

Podsumowanie i ewentualne zastosowanie praktyczne osiągnięć

Wiedza na temat efektu działania danego czynnika na środowisko glebowe bezpośrednio związane z rośliną jest bardzo często trudna do oszacowania, zwłaszcza jeśli chodzi o czynniki naturalne lub wprowadzenie czynników pochodzenia antropogenicznego.

Dysponując narzędziami biologii molekularnej udało się częściowo przybliżyć procesy przemiany pierwiastków w ryzosferze i glebie roślin uprawnych, poznać szczegółowe zmiany w składzie taksonomicznym mikrobioty, czy udowodnić, że pasożytnictwo grzybów to proces złożony i oparty na współpracy mikroorganizmów. Należy zwrócić uwagę, że procesy dziejące się nawet w dość statycznym środowisku jakim jest monokultura roślin rolniczych, są nadal nieodkryte i czasem wejście choroby lub szkodnika może nieoczekiwanie i drastycznie obniżyć plon. Z drugiej strony, dowiedziono że, odporność na niekorzystne warunki biotyczne i abiotyczne ponad tysiącletnich monokultur winorośli w krajach basenu morza śródziemnego jest zawdzięczana właśnie mikroorganizmom. Ze względu na wiele procesów fizjologicznych roślin uprawnych i mikroorganizmów strefy korzeniowej, które zachodzą jednocześnie lub kaskadowo po sobie, interpretacja jest trudna, a często wręcz niemożliwa. Niemniej jednak dzięki coraz niższym kosztom analiz metagenomicznych mikrobioty i metatranskryptomu roślin, możemy dostarczyć dużych zasobów danych. Coraz częściej używane narzędzia statystyczne, takie jak analiza połączeń (ang. co-occurrence network analysis) umożliwiają wyciągnięcie wniosków z doświadczeń wieloczynnikowych i dużego zestawu wyników, co zostało pokrótce opisane w dalszej części niniejszego opracowania.

Podsumowanie głównych wniosków z badań:

1. **Wpływ wielkości nanocząstek metali na mikrobiotę ryzosfery:** Badania wykazały, że większe nanocząstki metali, zarówno srebra, jak i tytanu, są mniej toksyczne dla mikroorganizmów strefy korzeniowej niż ich mniejsze odpowiedniki. Obserwowano, że małe cząstki – szczególnie nanocząstki srebra – wykazują silniejsze działanie bakteriobójcze, co może niekorzystnie wpływać na różnorodność i funkcjonowanie mikrobiomu ryzosfery. W związku z tym sugeruje

się ostrożność przy stosowaniu nanomateriałów w agrotechnice, ze względu na ich potencjalny wpływ na mikrobiotę gleby i możliwe zakłócenie równowagi ekologicznej w strefie korzeniowej roślin. Niemniej jednak większe formy nanocząstek >70 nm można uznać za poprawiające strukturę mikrobiomu, co może przyczynić się do poprawy obiegu pierwiastków biogennych w ryzosferze.

2. **Znaczenie dodatków organicznych w poprawie jakości gleby i ochronie biologicznej:**
   Wermikompost oraz mączka owadzia okazały się skutecznymi dodatkami poprawiającymi właściwości nawozowe gleby oraz zwiększającymi aktywność mikroorganizmów korzystnych dla roślin. Zastosowanie tych materiałów przyczyniło się do zwiększenia liczebności bakterii z rodzaju *Bacillus*, które produkują lipopeptydy o działaniu fungistatycznym – takich jak surfaktyna, fengicyna i ituryna – wykazujących aktywność wobec patogennych grzybów. Co istotne, mączka owadzia, mimo powolnego tempa mineralizacji, może wspierać rozwój bakterii denitryfikacyjnych w ryzosferze, co jednak niesie ryzyko strat azotu w wyniku procesów denitryfikacji.
3. **Rola bakterii w pasożytniczych interakcjach grzybów z roślinami:**
   W ryzomorfach patogenicznego grzyba *Armillaria ostoyae* zidentyfikowano obecność bakterii wiążących azot oraz bakterii z rodzaju *Bacillus*, co sugeruje ich możliwą rolę jako fakultatywnych symbiontów wspomagających pasożyta. Wyniki te wskazują, że niektóre bakterie strefy korzeniowej mogą aktywnie uczestniczyć w procesie pasożytnictwa roślin, potencjalnie wzmacniając infekcyjność grzybów patogennych. Takie interakcje mogą mieć znaczące konsekwencje dla zdrowia roślin i strategii biologicznej ochrony upraw.

Jako aspekt potencjalnie aplikacyjny podkreślam stosunkowo bezpieczne działanie dużych cząstek ditlenku tytanu oraz dużych nanocząstek srebra o ładunku ujemnym, co po przetestowaniu w warunkach polowych może znaleźć zastosowanie jako biostymulant oraz środek ochrony roślin. Podkreślam też możliwość wykorzystania pozostałości po produkcji owadów, ponieważ charakteryzują się dużym potencjałem nawozowym, ale też za ich wykorzystaniem przemawia dynamicznie rozwijający się przemysł produkcji owadów na cele paszowe i spożywcze. Przyszłe planowane projekty będą skupiały się z wytyczenia modelu i wartości progowych dla rearanżacji mikrobioty w stronę strategii rozmnażania typu

r oraz w efekcie jej metabolizmu, a także energochłonności i stabilności układu, co jest aktualnie trendem w najnowszych badaniach z zakresu agrobiotechnologii.

Bibliografia

Adedayo A.A., Babalola O.O. 2023. Fungi That Promote Plant Growth in the Rhizosphere Boost Crop Growth. Journal of Fungi 9: 239. https://doi.org/10.3390/jof9020239.

Ahmed A., He P., He P., Wu Y., He Y., Munir S. 2023. Environmental effect of agriculture-related manufactured nano-objects on soil microbial communities. Environment International. 173: 107819. https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.107819.

Ayuso-Sacido A., Genilloud O. 2005. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. Microbial Ecology 49(1): 10-24. https://doi.org/10.1007/s00248-004-0249-6.

Bhat B.A., Tariq L., Nissar S., Islam S.T., Islam S.U., Mangral Z., Ilyas N., Sayyed R.Z., Muthusamy G., Kim W., Dar T.U.H. 2022. The role of plant-associated rhizobacteria in plant growth, biocontrol and abiotic stress management. Journal Applied Microbiology 133(5): 2717-2741. https://doi.org/10.1111/jam.15796.

Hemkemeyer M., Christensen B.T., Martens R., Tebbe C.C. 2015. Soil particle size fractions harbour distinct microbial communities and differ in potential for microbial mineralisation of organic pollutants. Soil Biology and Biochemistry 90: 255-265. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.08.018.

Hu J., Wei Z., Friman V-P., Gu S-H., Wang X-F., Eisenhauer N., Yang T-J., Ma J., Shen Q-R., Xu Y-C., Jousset A. 2016. Probiotic diversity enhances rhizosphere microbiome function and plant disease suppression. mBio 7(6): e01790–e01716. https://doi.org/10.1128/mBio.01790-16.

Jia X., Shi N., Tang W., Su Z., Chen H., Tang Y., Sun B., Zhao L. 2022. Nano-hydroxyapatite increased soil quality and boosted beneficial soil microbes. Plant Nano Biology. 1: 100002. https://doi.org/10.1016/j.plana.2022.100002.

Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., Glockner O. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Research 41(1), e1. https://doi.org/10.1093/nar/gks808.

Koper T.E., El-Sheikh A.F., Norton J.M., Klotz M.G. 2004. Urease-encoding genes in ammonia-oxidizing bacteria. Applied and Environmental Microbiology 70: 2342-2348. https://doi.org/10.1128/aem.70.4.2342-2348.2004.

Ling N., Wang T., Kuzyakov Y. 2022. Rhizosphere bacteriome structure and functions. Nature Communications 13: 836. https://doi.org/10.1038/s41467-022-28448-9.

Ma L., Lu Y., Yan H. et al. 2020. Screening of cellulolytic bacteria from rotten wood of Qinling (China) for biomass degradation and cloning of cellulases from *Bacillus methylotrophicus*. BMC Biotechnology 20: 2. https://doi.org/10.1186/s12896-019-0593-8.

Martin K.J., Rygiewicz P.T. 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. BMC Microbiology 18: 28. https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-28.

Mendes R., Raaijmakers J. 2015. Cross-kingdom similarities in microbiome functions. ISME J 9: 1905–1907. https://doi.org/10.1038/ismej.2015.7.

McSpadden Gardener, B., Weller, D. 2001. Changes in populations of rhizosphere bacteria associated with take-all disease of wheat. Applied and Environmental Microbiology 67: 4414-4425. https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4414-4425.2001.

Meyer F., Paarmann D., D'Souza M., Olson R., Glass E.M., Kubal M., Paczian T., Rodriguez A., Stevens R., Wilke A., Wilkening J., Edwards R.A. 2008. The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. BMC Bioinformatics 9: 386. https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-386

Michotey V., Méjean V., Bonin P. 2000. Comparison of methods for quantification of cytochrome cd(1)-denitrifying bacteria in environmental marine samples. Applied and environmental microbiology, 66(4): 1564–1571. https://doi.org/10.1128/aem.66.4.1564-1571.2000.

Mora I., Cabrefiga J., Montesinos E., 2011. Antimicrobial peptide genes in Bacillus strains from plant environments. International Microbiology 14: 213–223. https://doi.org/10.2436/20.1501.01.151.

Rotthauwe J.H., Witzel K.P., Liesack W. 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. Applied and Environmental Microbiology. 63(12): 4704-4712. https://doi.org/10.1128/AEM.63.12.4704-4712.1997.

Rösch C., Bothe H. 2005. Improved assessment of denitrifying, N_2-fixing, and total-community bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism analysis

using multiple restriction enzymes. Applied and Environmental Microbiology 71: 2026–2035. https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.2026-2035.2005.

Saritha G.N.G., Anju T., Kumar. 2022. Nanotechnology - Big impact: How nanotechnology is changing the future of agriculture? Journal of Agriculture and Food Research 10: 100457. https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100457.

Schnerr H., Niessen L. Vogel R.F. 2001. Real time detection of the *tri5* gene in *Fusarium* species by LightCycler-PCR using SYBR Green I for continuous fluorescence monitoring. International Journal of Food Microbiology 71: 53-61. https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00579-7.

Song Y., Liu C., Finegold S.M. 2004. Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. Applied and Environmental Microbiology 70: 6459-6465. https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6459-6465.2004.

Sporbert M., Welk E., Seidler G., et al. 2021. Different sets of traits explain abundance and distribution patterns of European plants at different spatial scales. Journal of Vegetation Science. 32:e13016. https://doi.org/10.1111/jvs.13016.

Sun S., Xue R., Liu M., Wang L., Zhang W. 2023. Research progress and hotspot analysis of rhizosphere microorganisms based on bibliometrics from 2012 to 2021. Frontiers in Microbiology 23(14):1085387. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1085387.

Suanthie Y., Cousin M.A., Woloshuk C.P. 2009. Multiplex real-time PCR for detection and quantification of mycotoxigenic *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. Journal of Stored Products Research. 45: 139-145. https://doi.org/10.1016/j.jspr.2008.12.001.

Svercel M., Duffy B., Défago G. 2007. PCR amplification of hydrogen cyanide biosynthetic locus *hcnAB* in *Pseudomonas* spp. Journal of Microbiological Methods 70: 209-213. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.03.018.

Tesser M.E., Guilger M., Bilesky-José N., Risso W.E., de Lima R., Martinez C.B.D.R. 2022. Biogenic metallic nanoparticles (Ag, TiO_2, Fe) as potential fungicides for agriculture: are they safe for the freshwater mussel Anodontites trapesialis? Chemosphere. 309(1):136664. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136664.

Throbäck I.N., Enwall K., Jarvis A., Hallin S. 2004. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. FEMS Microbiology Ecology, 49(3): 401-417, https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.04.011.

Veliz E.A., Martínez-Hidalgo P., Hirsch A.M. 2017. Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol. AIMS Microbiology. 4;3(3):689-705. https://doi.org/10.3934 /microbiol.2017.3.689.

Yu Y., Lee C., Kim J., Hwang S. 2005. Group-specific primer and probe sets todetect methanogenic communities using quantitative real-time polymerasechain reaction. Biotechnology and Bioengineering. 89: 670-679. https://doi.org/10.1002/bit.20347.

Zhao Y., Selvaraj J.N., Xing F., Zhou L., Wang Y., Song H., Tan X., Sun L., Sangare L., Folly Y.M., Liu Y. 2014. Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. PLoS One. 20;9(3):e92486. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092486.

4.4. Pozostałe osiągnięcia naukowe

Mikroorganizmy kolonizujące rośliny i ich funkcje

Dane zawarte w tym rozdziale są częściowo powiązane z tematem statutowym Katedry "Biologia i możliwości zwalczania wybranych patogenów roślin". Uzyskane wyniki badań były możliwe dzięki współpracy z prof. dr hab. Tomaszem Kurowskim i dr hab. Martą Damszel, prof. UWM, będącymi pracownikami Katedry w której jestem zatrudniony. Badania te koncentrowały się głównie na grzybach patogenicznych zasiedlających rośliny **(Załącznik 4; 4.A.1-4.A.4., 4.A.11., 7.4.-7.13., 7.16.-7.32., 7.34., 7.35., 4.B.2., 4.B.5. i 4.B.6)**, poniżej opisano wybrane wyniki badań.

Mikroorganizmy zasiedlające roślinę mogą decydować o zdrowotności, kondycji i plonie. W pracy **4.A.11. (Załącznik 4)** dotyczącej mykobioty endofitycznej traw, tj. tymotki łąkowej i życicy trwałej zaobserwowano, że tymotka łąkowa jest chętniej kolonizowana przez gatunki mogące być utajonymi patogenami roślin. Należy zwrócić uwagę, że pomimo braku wyraźnych objawów chorób, dominującymi grzybami endofitycznymi były: *Alternaria* spp., *Epicoccum nigrum*, *Microdochium balleyi* oraz należące do czterech gatunków *Fusarium* spp. Brak objawów chorób u traw może być efektem wykonywania pokosów lub korzyści z endofitycznego bytowania potencjalnych patogenów roślin w fazie nieinfekcyjnej. Aby oszacować zagrożenie spowodowane obecnością wymienionych grzybów zasiedlających wnętrze traw, w przyszłych pracach należy przebadać wyizolowane endofity pod względem chorobotwórczości oraz potencjału produkcji mykotoksyn. Kolejną pracą charakteryzującą mikroorganizmy związane z rośliną była praca **4.B.6. (Załącznik 4)**, opisująca grzyby związane z ryzomorfami *Armillaria* spp. na topoli osice. Obecność licznych grzybów kolonizujących ryzomorfę będących

potencjalnymi patogenami roślin tj.: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Epicocum nigrum*, *Fusarium* spp. i *Phoma* spp. może wskazywać na współudział tych grzybów w procesie rozkładu drewna. Jednakże, podobnie jak w przypadku wyżej opisanych traw, niemal zawsze dominujący udział miały potencjalnie pożyteczne grzyby antagonistyczne i saprotrofy. Przypuszczalnie transmisja dodatkowych patogenów na osikę przez działalność pasożyta ma marginalne znaczenie, niemniej jednak zalegające martwe drewno może stać się rezerwuarem szerszej puli patogenów roślin.

Pod względem działania środków chemicznych w latach 2011-2015 przeanalizowano wpływ ochrony chemicznej na dwie odmiany jęczmienia jarego w wieloletniej monokulturze i sześciopolowym zmianowaniu **(Załącznik 4; 4.B.5.**). Plamistość siatkowa (*Pyrenophora teres*), łamliwość źdźbła zbóż (*Tapesia yallundae*), fuzaryjna zgorzel podstawy źdźbła (*Fusarium* spp.) wystąpiły w każdym roku obserwacji, a fuzarioza kłosów (*Fusarium* spp.) i rynchosporioza zbóż (*Rhynchosporium secalis*) w dwóch latach obserwacji. W monokulturze zaobserwowano silniejsze objawy plamistości siatkowej i rynchosporiozy zbóż, natomiast w zmianowaniu obserwowano większe nasilenie fuzariozy kłosów i łamliwości źdźbła zbóż. Zastosowanie herbicydu nasiliło objawy plamistości siatkowej i fuzaryjnej zgorzeli, ale ograniczyło pojaw innych chorób jęczmienia.

Wpływ pofermentów na glebę

Pomoc przy pracy doktorskiej Pani dr inż. Wiolety Radawiec (Promotor prof. hab. Janusz Gołaszewski, promotor pomocniczy dr inż. Barbara Kalisz), zaowocowała wspólną publikacją naukową **(Załącznik 4; 4.A.29.).** W badaniach analizowano wpływ pofermetów (tj. płynnego, suszonego i poddanego pirolizie) na uprawę *Miscanthus giganteus* w porównaniu z nawożeniem mineralnym. Na podstawie wyników stwierdzono, że dodatek pofermentów może konkurować z nawożeniem mineralnym, zwłaszcza w odniesieniu do zawartości węgla i azotu ogólnego, oraz przyswajalnych form P, K i Mg. Stosowania pofermentów ma przewagę pod względem oddychania glebowego oraz ładunku bakterii i grzybów, co w efekcie sprzyja mineralizacji substancji przy zachowaniu odpowiedniego stosunku C:N. Mimo to zaobserwowano różnicę w zachowaniu pofermentu w zależności od typu. Poferment zawierający biowęgiel jest odporny na nadmierną mineralizację, co prowadzi do równomiernego udostępniania substancji pokarmowej roślinie i ograniczeniu ich strat. Należy podkreślić, że współpraca z dr inż. Barbarą Kalisz nadal jest utrzymywana i dalsze prace naukowe są w trakcie realizacji.

Poprawa jakości pasz

Ostatnim z obszarów badawczych wchodzących w zakres moich zainteresowań jest bezpieczeństwo pasz. Badania rozpoczęły się w czasie studiów doktoranckich współpracą z firmą Sowul&Sowul oraz od badań potencjału zakiszania i jakości mikrobiologicznej ślazowca pensylwańskiego (*Sida hermaphrodita*) będących owocem nawiązanej współpracy z Prof. hab. Cezarym Purwinem z Katedry Żywienia Zwierząt, Paszoznawstwa i Hodowli Bydła, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Badania wykazały, że ślazowiec pensylwański ulega ekstensywnej fermentacji mlekowej, niemniej jednak grzyby toksynotwórcze są skutecznie eliminowane podczas procesu zakiszania **(Załącznik 4; 4.A.5.).** W tym samym czasie analiza mikrobiologiczna zakiszanego buraka cukrowego na cele biogazowe **(Załącznik 4; 7.7.**) wykazała obecność specyficznego konsorcjum bakterii kwasu mlekowego, zostały wyizolowane i zakonserwowane wchodząc w skład kolekcji katedralnej. Dalsze badania przeprowadzone po uzyskaniu stopnia doktora skupiły się na analizie wpływu dodatków mikrobiologicznych, zarówno z własnej kolekcji szczepów jak i preparatów komercyjnych. W pracy **4.A.13. (Załącznik 4)** opisano efekt zastosowania preparatu komercyjnego z mieszanki różnych gatunków bakterii kwasu mlekowego oraz działanie pojedynczych szczepów i konsorcjów bakterii rodzaju *Lactobacillus* na zakiszanie traw. Po aplikacji biopreparatów i 60 dniowym zakiszaniu życicy trwałej, zaobserwowano że mieszanina *Lactobacillus plantarum*, *L. paracasei* i *L. casei* (szczepów wyizolowanych w ramach projektu przedstawionego na konferencji **7.7. (Załącznik 4)**) działa najlepiej na proces zakiszania, przy jednoczesnym ograniczaniu aktywności nie tylko grzybów toksynotwórczych, ale też niepożądanych bakterii rodzaju *Clostridium*. W porównaniu do traw, większy problem niepożądanego efektu działalności mikroorganizmów na substrat przed procesem zakiszania dotyczy kukurydzy. Rozwój technologii pozyskiwania etanolu na cele energetyczne spowodował duże zapotrzebowanie na kukurydzę, niestety proces niekontrolowanego zakiszania, rozwój grzybów toksynotwórczych lub drożdży często zachodzi już podczas transportu.

W ramach dalszej współpracy z Katedrą Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa, Wydziału Bioinżynierii Zwierząt, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, brałem też udział w badaniach dotyczących terminu zbioru i wysokości cięcia ślazowca pensylwańskiego na zawartość karotenoidów i tokoferoli. Na podstawie uzyskanych wyników badań zaobserwowano, że zielonka roślin ciętych najwyżej i kiszonka z roślin ciętych na wysokości 25 cm zawierały najwięcej β-karotenu, kolejno 114 i 45 mg kg^{-1} suchej

masy i α-tokoferolu, kolejno 87 i 3,5 mg kg^{-1} suchej masy. Warianty te cechowały się też wyższą zawartością witaminy E. Zielonka zebrana 25 czerwca i kiszonka ze zbioru 11 czerwca charakteryzowały się najwyższymi zawartościami karotenoidów i tokoferoli **(Załącznik 4; 4.A.10.).**

Dalsze badania są prowadzone we współpracy z innymi instytucjami i zostały opisane w następnym rozdziale.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

Przed osiągnięciem stopnia doktora

Przed osiągnięciem stopnia doktora nauk rolniczych moje zainteresowania skupiały się na bakteriozach ziemniaka i sposobie ograniczania bakterioz, co było przedmiotem mojego przewodu doktorskiego. Zagadnienia związane z biologią molekularną mikroorganizmów zawdzięczam czynnemu uczestnictwu w kole naukowym mikrobiologów molekularnych COCCUS oraz zagadnieniom pracy inżynierskiej i magisterskiej. Wdrożenie w zagadnienia fitopatologii i ochrony roślin podczas przewodu doktorskiego zawdzięczam mojemu promotorowi pracy doktorskiej profesorowi Tomaszowi Kurowskiemu oraz wiedzy nabytej na stażu naukowym w Instytucie Ogrodnictwa odbytego pod opieką Profesora Piotra Sobiczewskiego oraz Profesor Joanny Puławskiej. Były to też początki mojej pracy z grzybowymi patogenami roślin, analizy społeczności mikroorganizmów związanych z roślinami uprawnymi i wykorzystania bakterii jako antagonistów grzybów fitopatogenicznych i promotorów wzrostu roślin. Rozpocząłem też współpracę z firmą Sowul&Sowul, gdzie doskonaliłem wiedzę o produkcji nowych odmian traw i roślin bobowatych. Efektem działania mojej pracy przed otrzymaniem tytułu doktora jest dziewięć publikacji naukowych **(Załącznik 4; 4.A.1.-4.A.5. i 4.B.1.-4.B.4.)** oraz liczne wystąpienia na konferencjach naukowych **(Załącznik 4; 7.1.-7.25.).**

Zagadnienia w ramach współpracy z innymi jednostkami naukowymi niż miejsce zatrudnienia:

Wpływ dodatków glebowych na jakość gleby i potencjał wzrostu roślin

Ze względu na politykę Krajów Unii Europejskiej i działania w ramach Europejskiego Zielonego Ładu zalecane jest ograniczenie użycia syntetycznych substancji

chemicznych w produkcji roślinnej. Naturalne i organiczne dodatki doglebowe powinny wpływać pozytywnie na roślinę, być opłacalne ekonomicznie oraz w mniejszym stopniu oddziaływać na środowisko niż chemiczne substancje syntetyczne. W pracach **4.A.12.**, **4.A.29., 4.B.5. i 2.1. (Załącznik 4)** został omówiony wpływ doglebowego dodatku pofermentów, trocin i wermikompostu.

Generalnie dodatek trocin do gleby obszarów leśnych i porolnych spowodował zwiększenie udziału tlenowych bakterii przetrwalnikujących (m.in. rodzaje: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Psychrobacillus*) i promieniowców, obniżając udział proteobakterii. Bakterie te produkują substancje fungistatyczne, co w rezultacie spowodowało obniżenie aktywności grzybów pasożytniczych. Podobne zależności zaobserwowano po doglebowej aplikacji wermikompostu pod sadzonki modrzewia. W glebie do której dodano wermikompost w dawce 10 lub 20% v/v **(Załącznik 4; 4.A.12)** zaobserwowano zwiększenie udziału bakterii rodzaju *Bacillus* i zmniejszenie grzybów toksynotwórczych, ponadto zaobserwowano pojawienie się mikroorganizmów niosących geny produkcji substancji z grupy lipopeptydów o właściwościach fungistatycznych. Po dwóch latach (coroczna aplikacja), w porównaniu do gleby nienawożonej, stan gleby wskazywał na trzykrotnie wyższą zawartość azotu mineralnego i dwukrotnie wyższą zawartość magnezu niezależnie od dawki, przynajmniej 10-krotnie wyższą zawartość potasu w dawce 10% i ok 19-krotnie wyższą w przypadku dawki 20%, oraz zwiększenie fosforu, kolejno czterokrotne i sześciokrotne. Publikacja **4.A.12. (Załącznik 4)** zawiera wstępne wyniki, które posłużyły do opracowania bardziej szczegółowych badań w obrębie ryzosfery, stanowiących część osiągnięcia **(Załącznik 4; P4.**). Dzięki współpracy zaprezentowano wyniki badań na konferencjach **(Załącznik 4; 7.23., 7.24. i 7.26.)**.

Efekt powyższych prac badawczych był możliwy dzięki współpracy z dr hab. Magdaleną Oćwieją prof. IKiFP PAN z Instytutu Katalizy i Fizykochemii powierzchni PAN, prof. dr hab. inż. Arkadiuszem Telesińskim z Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego, Prof. dr hab. Martą Wrzosek z Uniwersytetu Warszawskiego, dr Katarzyną Kubiak z Instytutu Lotnictwa – Sieci Badawczej Łukasiewicz, dr inż. Katarzyną Sikorą z Instytutu Badawczego Leśnictwa, dr hab. inż. Anną Gorczyca, prof. URK z Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie oraz dr inż. Anitą Zapałowską z Uniwersytetu Rzeszowskiego.

Zbiorczym dziełem dotyczącym wspomagania funkcjonowania agroekosystemu metodami biologicznymi i biotechnicznymi było opracowanie przy współpracy z Profesor Anną Gorczycą z Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołątaja w Krakowie obszernego

fragmentu w monografii **(Załącznik 4; 2.2.)**. Rozdział ten charakteryzuje bioprodukty, w tym dodatki wspomagające wzrost roślin uprawnych w myśl aktualnych programów i strategii Krajów Unii Europejskiej.

Oddziaływanie nanocząstek metali na roślinę

W zakres tego tematu badawczego wchodzą prace **4.A.21., 4.A.24., 4.A.25., 4.A.28. (Załącznik 4)**. Moje zainteresowanie nanocząstkami już zostało przedstawione w części dotyczącej osiągnięcia naukowego w odniesieniu do mikrobioty środowiska glebowego, niemniej jednak aspekt oddziaływania nanocząstek na fizjologię roślin jest kluczowy w aspekcie fitotoksyczności. W pracy **(Załącznik 4; 4.A.24.)** scharakteryzowano zmiany parametrów wzrostu i fotosyntezy na modelowe rośliny jedno (pszenica zwyczajna, sorgo) i dwuliścienne (rzeżucha pospolita, gorczyca biała) pod wpływem różnych form nanocząstek srebra. W pracy użyto nanocząstek stabilizowanych: cytrynianem trisodu (TCSB-AgNPs), kwasem taninowym (TA-AgNPs), chlorowodorkiem cysteaminy (CHSB-AgNPs). Dwa pierwsze koloidy wykazywały ujemny ładunek powierzchniowy, natomiast ostatni z wymienionych, dodatni ładunek. Wszystkie nanocząstki posiadały rozmiar ok 15 nm. Zastosowane stężenie wynosiło 50 mg L^{-1}, a wariant porównawczy stanowiło srebro jonowe ($AgNO_3$), kontrolę stanowiły rośliny traktowane wodą. Zarówno zastosowane nanocząstki, jak i srebro jonowe spowodowały redukcję korzeni i ograniczenie dynamiki kiełkowania pszenicy, sorga i rzeżuchy. W przypadku ostatniej z wymienionych roślin i gorczycy zaobserwowano też zmniejszenie powierzchni blaszki liściowej. Powyższe efekty były najsilniej zauważalne w przypadku $AgNO_3$ i nanoczastek o ładunku dodatnim, ponadto zastosowanie tych substancji działało bardziej toksycznie na PSII w porównaniu z nanocząstkami o ładunku ujemnym. Ze względu na wskazanie form nanocząstek srebra o działaniu fitotoksycznym oraz upośledzenie konkretnych komponentów układu fotosyntetycznego, praca ta cieszy się dużym zainteresowaniem i jest chętnie cytowana przez innych autorów publikacji naukowych.

W przedstawionych badaniach wyraźnie zaznaczył się negatywny wpływ srebra w postaci jonowej. Na rynku dostępnych jest kilka preparatów o działaniu dezynfekcyjnym, przeznaczonych również do wykorzystania w produkcji roślinnej, jednak kolejne badania dotyczące zarówno srebra jonowego, jak i produktów komercyjnych stosowanych w uprawie pszenicy (**Załącznik 4; 4.A.25., 4.A.28**) potwierdziły jego stosunkowo niewielką przydatność w tej uprawie. Z kolei, ze względu na fungistatyczne właściwości nanocząstek, między innymi wobec *Fusarium* spp. (**Załącznik 4; 4.A.21**), zastosowanie niskich stężeń

(<20 mg L^{-1}) nanocząstek o ujemnym ładunku okazało się nie tylko bezpieczne dla pszenicy, lecz także skutecznie chroniło rośliny przed infekcjami grzybowymi oraz korzystnie wpływało na parametry biometryczne, w tym na plonowanie. Oddziaływanie nanocząstek srebra o ujemnym ładunku nie spowodowało drastycznych, negatywnych zmian na mikrobiom glebowy, co zostało też potwierdzone w osiągnięciu naukowym **(Załącznik 4; P5.)**. Działanie fungistatyczne oraz biostymulacja pszenicy przez niskie stężenia nanocząstek srebra jest obiecującą alternatywą dla zarejestrowanych środków ochrony roślin i biostymulatorów wzrostu roślin. Powyższe badania były efektem współpracy zespoły w skład którego wchodzili: dr hab. Magdalena Oćwieja prof. IKiFP PAN, dr hab. inż. Anna Gorczyca, prof. URK, dr hab. inż. Ewa Pociecha, prof. URK, dr inż. Ewelina Matras (URK) oraz dr inż. Wiktor Halecki (Instytut Ochrony Przyrody PAN w Krakowie). Powyższe badania składały się na osiągnięcie stopnia doktora Pani dr inż. Eweliny Matras.

Część niniejszych badań i opublikowanych publikacji naukowych była rezultatem stażu naukowego w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN zrealizowanego w dniach 21.06 - 6.09.2021 (**Załącznik 6**).

Mikroorganizmy jako dodatki mikrobiologiczne w bionawożeniu i ochronie roślin

Dodatki mikrobiologiczne są często wykorzystywanym narzędziem biotechnologii środowiskowej. Najbardziej znanym zastosowaniem w tej dziedzinie nauki jest bioaugmentacja, czyli wykorzystanie mikroorganizmów do rekultywacji środowiska skażonego, a w rolnictwie jest to np. wprowadzanie bakterii współżyjących z roślinami bobowatymi. W ostatnich latach wzrost cen nawozów mineralnych spowodował zainteresowanie preparatami mikrobiologicznymi i badaniami w tym kierunku.

Bakterie pożyteczne można podzielić na bakterie wspomagające wzrost roślin (ang. PGPB, plant growth promoting bacteria) lub bakterie antagonistyczne będące alternatywą dla środków ochrony roślin. Pierwsze próby pozyskania i przetestowania PGPB wykazujących jednocześnie cechy antagonistyczne były prace przed osiągnięciem stopnia doktora **(Załącznik 4; 4.A.1., 4.A.4., 4.A.6., 4.B.1., 4.B.3., 4.B.4.)**, niemniej jednak tylko szczepy, tj. *Pseudomonas* sp. SP0113 i *Bacillus subtilis* SP-A9 wywierały istotnie pozytywny wpływ na roślinę i ograniczały rozwój patogenów. Szczepy te zastały przetestowane w warunkach polowych, a wyniki badań są aktualnie opracowywane. Nowsze badania **(Załącznik 4; 4.A.8., 4.A.9., 4.A.16.)** skupiły się na przeanalizowaniu antagonizmu wobec fitoaptogenów rodzaju *Fusarium* oraz wielu cech fizjologicznych bakterii ze stanowiska poddanego silnej antropopresji, tj. oczyszczalni ścieków oraz terenów

rolniczych. Analiza typowych cech promujących wzrost roślin, czyli: produkcji sideroforów, enzymów litycznych, rozpuszczania uwstecznionych form fosforu, przemian azotu, wykorzystania różnych źródeł węgla i produkcji fitohormonu-kwasu indolilooctowego (IAA), połączona z identyfikacją molekularną i badaniami wazonowymi na roślinach, pozwoliła uzyskać innowacyjne wyniki. Na podstawie uzyskanych danych zaobserwowano, że silny efekt promujący wzrost pszenicy i ochronę przed infekcją przez *Fusarium* spp. wykazują niektóre szczepy *Pseudomonas* spp., uznane za wręcz modelowe bakterie, niemniej jednak nie potwierdzono tego w przypadku rzepaku. W porównaniu do działania wyizolowanych szczepów *Pseudomonas* spp., to *Proteus* sp. działał najkorzystniej na tę roślinę uprawną. Po zastosowaniu tej bakterii protelitycznej, zaobserwowano najlepsze zwiększenie wzrostu fyllosfery oraz zdrowotności. Należy zwrócić uwagę, że bakterie rodzaju *Proteus* spp., dotąd nienotowane jako PGPB ani antagoniści wobec *Fusarium* spp. Na podstawie badań biochemicznych zaobserwowano, że cechą najsilniej oddziałującą na stymulację wzrostu rzepaku przy jednoczesnym, silnym antagonizmie wobec fitopatogena jest zdolność produkcji przez *Proteus* spp. wysokiego stężenia IAA. Efekt działalności tych bakterii jest aktualnie badany na innych roślinach, niestety ze względu na pochodzenie z oczyszczalni ścieków, efektywne szczepy muszą przejść też badania dotyczące antybiotykoodporności. Mimo to, produkcja fitohormonów przez bakterie wraz z szeregiem innych cech promujących wzrost roślin oraz możliwość zastosowania *Proteus* spp. jako biologicznego fungicydu dają bardzo obiecujące perspektywy w aspekcie aplikacyjnym.

Jednym z moich najnowszych obszarów zainteresowań jest wykorzystanie potencjału owadów i mikroorganizmów współżyjących z owadami (endosymbiontów) do zastosowania w rolnictwie i inżynierii środowiskowej. Podstawowy aspekt zastosowania w produkcji roślinnej został już opisany w osiągnięciu naukowym **(Załącznik 4; P3)**. Dodatkowym aspektem mogącym mieć udział w produkcji roślinnej jest stworzenie konsorcjum bakteryjnego, które wydajnie poprawia biometrię i plonowanie pomidora **(Załącznik 4; 4.A.26.)** lub zastosowanie odchodów owadzich (ang. frass) do wzbogacania podłoży stosowanych do wzrostu roślin **(Załącznik 4; 4.B.7.)**.

Efektem prac naukowych opisanych w tym podrozdziale są prezentacje wyników badań na konferencjach naukowych **(Załącznik 4; 7.10., 7.14., 7.15., 7.17., 7.19., 7.21., 7.27., 7.28. i 7.34.)** oraz wspomniany wcześniej rozdział w monografii naukowej **(Załącznik 4; 2.2.)**, gdzie zostały opisane także bioprodukty na bazie mikroorgnizmów do zastosowania w rolnictwie. Pod względem badawczym i pomocy analitycznej cykl tych badań zawdzięczam dr hab. Krzysztofowi Krawczykowi (IOR-PIB Poznań). Dzięki współpracy

z Instytutem Ochrony Roślin-PIB, otrzymano stabilne konsorcjum bakterii, które można wykorzystać komercyjnie do stymulacji wzrostu pomidora **(Załącznik 4; 4.A.6., 4.A.9., 4.A.16., 4.A.26.)**.

W 2025 roku odbyłem **staż naukowy** w Uniwersytecie Mendla w Brnie, Czechy "The Laboratory of Environmental Biotechnology of Plants and Microalgae, Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University in Brno" (załącznik 6) Staż naukowy dotyczył pozyskania i wstępnej identyfikacji sinic *Anabena* spp. z jaskiń i możliwości wykorzystania w biostymulacji wzrostu roślin. Aktualnie trwają pracę nad przygotowaniem biopreparatu zawierającego unikatowe izolaty *Anabaena* sp. do ochrony roślin przed patogenami przy jednoczesnej możliwości akumulacji azotu cząsteczkowego. Wstępne wyniki wskazują, że magazynowanie azotu przewyższa wydajność akumulacji N_2 w porównaniu do *Pseudomonas putida* oraz *Azotobacter* spp.

Poprawa jakości pasz i roślinnych produktów bioenergetycznych

Na podstawie przeprowadzonych wcześniej badań (podrozdział 4.4 „poprawa jakości pasz") nawiązano współpracę z jednostkami zewnętrznymi w celu prowadzenia dalszych badań na temat bezpieczeństwa pasz. W pracy **4.A.15. (Załącznik 4)**, powstałej przy współpracy z Prof. dr hab., Andrzejem Skoczowskim, (Uniwersytet Pedagogiczny w Krakowie/Instytut Fizjologii Roślin PAN w Krakowie), została opracowana metoda diagnostyczna umożliwiająca jakościową i półilościową detekcję skażenia mikrobiologicznego kukurydzy za pomocą kalorymetru izotermicznego TAM III. Otrzymane wyniki były efektem porównania wyników krzywych kalorymetrycznych z wynikami real time PCR, czyli ładunku najbardziej uciążliwych mikroorganizmów tj.: bakterii przetrwalnikujących, dzikich szczepów *Lactobacillus* spp., *Fusarium* spp. i drożdży, a także wielkość całkowitego obciążenia mikrobiologicznego. Przez niską kosztochłonność wykonania analizy kalorymetrycznej zastosowanie tej metody może znaleźć zastosowanie komercyjne w diagnostyce skażenia mikrobiologicznego produktów roślinnych.

Kolejne prace opierające się na doświadczeniu polowym dotyczyły zastosowania tryptofanu oraz nanocząstek ditlenku tytanu jako stymulatorów wzrostu życicy trwałej **(Załącznik 4; 4.A.19., 4.A.31.)**. Charakterystyka chemiczna i fizyczna nanocząstek została przeprowadzona przez dr hab. Magdalenę Oćwieję prof. IKiFP PAN (Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni w Krakowie PAN), co pomogło przewidzieć efekt tych nanocząstek i zaprojektować doświadczenie polowe. Po aplikacji preparatów zebrano pokos

i poddano zakiszaniu. W badaniach tych analizowano jakość paszową i mikrobiologiczną zielonki i kiszonki. W przypadku L-tryptofanu **(Załącznik 4; 4.A.19.)** testowano dawki 0,05, 0,5 i 5 kg ha^{-1} tego aminokwasu. Najwyższa dawka spowodowała zwiększenie uzysku suchej masy zielonki o 15% z jednoczesnym zwiększeniem zawartości cukrów rozpuszczalnych w wodzie (WSC). Miało to odzwierciedlenie w najkorzystniejszym przebiegu procesu fermentacji (najniższe pH ~4,59). Należy zwrócić uwagę, że zastosowanie dawek 0.5 i 5 kg ha^{-1} skutecznie ograniczyło ładunek *Clostridium* spp. i stężenie $N\text{-}NH_3$ w otrzymanych kiszonkach. W przypadku nanocząstek ditlenku tytanu testowano nanocząstki małej i dużej wielkości w dawce 100 mg L^{-1} (10g ha^{-1}). Użycie TiO_2NPs spowodowało polepszenie plonowania na podobnym poziomie jak preparat komercyjny (tytan w postaci cząsteczkowej). Zastosowanie dużych nanocząstek spowodowało wzrost zawartości białka w zielonce życicy trwałej (o ok 9%) oraz zwiększenie zawartości węglowodanów rozpuszczalnych w wodzie. Stwierdzono też, że nanocząstki o dużej wielkości powstrzymują rozwój bakterii rodzaju *Clostridium* w procesie zakiszania.

Produkcja organiczna czy konwencjonalna a jakość wina

Badania jakości moszczu z uprawy ekologicznej i konwencjonalnej wykonałem we współpracy z zespołem naukowców z Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, Uniwersytetem Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy oraz Uniwersytetem Kaliskim. Badania dotyczyły aspektów chemicznych, biochemicznych i fitopatologicznych moszczu z obu systemów uprawy. Najważniejszą obserwacją było to, że niezależnie od systemu wykryto patogeny roślin. Fungicydy dostosowane do systemu ekologicznego skuteczniej ograniczyły nasilenie sprawców mączniaka prawdziwego winorośli, natomiast w systemie konwencjonalnym zaobserwowano zmniejszenie występowania sprawców szarej pleśni. W aspekcie globalnym to jednak system ekologiczny był bardziej wartościowy, zwłaszcza pod względem wyższej zawartości substancji o działaniu prozdrowotnym. Wynikiem przeprowadzonych badań jest publikacja naukowa (**Załącznik 4; 4.A.41.**)

Możliwość prowadzenia produkcji roślinnej w warunkach marsjańskich (współpraca-międzynarodowa)

Nawiązanie stałej współpracy z Wiegerem Wamelinkiem, ekologiem i egzobiologiem z Wageningen University and Research, jednym z najbardziej

rozpoznawalnych badaczy zajmujących się wzrostem roślin na podłożach symulujących regolit marsjański i księżycowy, umożliwiło przeprowadzenie wspólnych badań naukowych w szerokim, interdyscyplinarnym gronie specjalistów (**Załącznik 4; 4.A.37**.). Symulanty regolitu marsjańskiego charakteryzują się niską zawartością składników odżywczych dostępnych dla roślin oraz wysokim pH, co stwarza niekorzystne warunki dla ich wzrostu i rozwoju. Doświadczenie zostało zaplanowane we współpracy z Wiegerem Wamelinkiem, który uczestniczył również w interpretacji oraz opracowaniu wniosków wynikających z uzyskanych rezultatów. Badania polegały na obserwacji wzrostu pszenicy jarej w ryzotronach. Regolit wzbogacony został niewielkimi dawkami wermikompostu, co miało na celu wzbogacenie systemu korzeniowego w mikroorganizmy i stymulację wzrostu pszenicy. W badaniach potwierdzono zasiedlenie regolitu i strefy korzeniowej przez bakterie i określono strukturę metataksonomiczną powstałego konsorcjum. Wykazano też stymulujący efekt wzrostu roślin, niemniej jednak był on niższy niż wydajność wzrostu pszenicy na glebie. Przy współpracy z zespołem holenderskim został opracowany projekt NCN, mający na celu kontynuację badań, niestety nie uzyskał on finansowania. Aktualnie trwają prace nad wyselekcjonowaniem konsorcjum mikroorganizmów, które umożliwią wydajny wzrost roślin w warunkach stresowych.

Biopreparaty przeciwko grzybom patogenicznym (współpraca międzynarodowa)

W ramach działalności międzynarodowego konsorcjum złożonym z członków Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu oraz naukowców z Ukrainy (Wydział Ekologii i Biologii Ogólnej, Podolski Państwowy Uniwersytet Agrarno-Techniczny, Kamieniec Podolski, Ukraina) brałem udział w badaniach dotyczących identyfikacji zmian metataksonomicznych mykobioty fitopatogenicznej w glebie rolniczej, którą traktowano biopreparatami. Wyniki badań zostały zaprezentowane na konferencji naukowej (**Załącznik 4; 7.52.**).

„Wielkość ma znaczenie" (współpraca międzynarodowa)

Brałem udział w badaniach dotyczących relacji pomiędzy wielkością płatów lasów miejskich a ich charakterystyką ekologiczną i mikrobiologiczną. Badania dostarczyły istotnych danych potwierdzając, że większe płaty są bardziej stabilne pod względem ekologicznym i dysponują większą bioróżnorodnością i mogą przeciwdziałać niekorzystnemu efektowi „miejskiej wyspy ciepła". Badania były wykonane przy współudziale naukowców z Uniwersytetu Jagielońskiego i Uniwersytetu Opolskiego,

a koordynatorem badań był Hamed Azarbad z Wydziału Ekologii Ewolucyjnej Roślin z Uniwersytetu im. Filipa w Marburgu, Niemcy. Efektem badań jest publikacja naukowa (**Załącznik 4; 4.A.44.)**

Perspektywy badawcze po zdobyciu osiągnięcia naukowego.

Dalsze badania będą skupiały się na zastosowaniu nanocząstek metali w rolnictwie i ich oddziaływaniu na mikrobiom ryzosferowy w aspekcie przewidywania zmian biochemicznych w glebie i strefie korzeniowej. W najnowszym podejściu zastosowałem nowoczesną metodę analizowania sieci połączeń (ang. co-occurrence network analysis) pomiędzy danymi metagenomicznymi ryzosfery pszenicy a danymi z baz szlaków biochemicznych mikroorganizmów (np. MACADAM). Pozwoliło to na precyzyjne, wielopoziomowe określenie wpływu nanocząstek oraz innych czynników zewnętrznych i powiązań pomiędzy wieloma komponentami mikrobiomu, środowiska glebowego i rośliny. W aspekcie szczegółowym udało się powiązać szereg czynników wpływających na wykorzystanie składników pokarmowych, aktywności fitopatogenów oraz pożytecznych mikroorganizmów, czy też bakterii produkujących fitohormony i inne substancje aktywne. Wyniki badań zostały zaprezentowane na konferencjach naukowych **(Załącznik 4; 7.40., 7.43.)**. Głównymi partnerami w dalszych badaniach będą dr hab. Anna Gorczyca z Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie i dr hab. Magdalena Oćwieja prof. IKiFP PAN.

Nową gałęzią zainteresowań jest powiązanie mikrobiomu z roślinami pasożytniczymi. Temat ten jest efektem nawiązania niedawnej współpracy z prof. hab. Renatą Piwowarczyk oraz dr Karoliną Ruraż z Centrum Badań i Ochrony Różnorodności Biologicznej, Instytutu Biologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach. W wyniku współpracy opublikowano badania **(Załącznik 4; 4.A.27., 4.A.32., 4.A.43., 7.45.)**, w których scharakteryzowano bakteriobiom i mykobiom kolonizujący kwiaty roślin holopasożytniczych (Orobanchaceae). Na podstawie analizy stwierdzono, że pomimo występowania fakultatywnych fitopatogenów, konsorcjum bakterii i drożdży o cechach potencjalnie antagonistycznych jest w stanie chronić roślinę przed potencjalnymi patogenami roślin. Oprócz nielicznych taksonów związanych ściśle z rośliną, prawdopodobny transfer mikroorganizmów ze środowiska na kwiaty zachodzi z udziałem owadów. Aktualnie z tym zespołem wykonuję badania na temat struktury mikrobioty kolejnych gatunków roślin holopasożytniczych oraz powiązania mikroorganizmów glebowych z mechanizmami pasożytnictwa tych roślin.

Kolejną, nową współpracę nawiązałem z zespołem prof. dr hab. Andrzeja Bieganowskiego z Instytutu Agrofizyki PAN w Lublinie. Wspólne prace dotyczą wpływu na mikrobiom glebowy i wykorzystania potencjału nawozowego pozostałości z hodowli czarnej muchy (*Hermetia illucens*). Pierwsze wyniki badań zostały zaprezentowane na konferencji naukowej **(Załącznik 4; 7.46.)**. Aktualnie z dr inż. Piotrem Bulakiem z Instytutu Agrofizyki PAN w Lublinie jako konsorcjant realizuję projekt „Czy biowęgiel wpływa na mikrobiotę jelitową i zrównoważony rozwój czarnej muchy?".

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę

W swojej karierze naukowej prowadziłem ćwiczenia i wykłady dla studentów Wydziału Rolnictwa i Leśnictwa. Na Wydziale Rolnictwa i Leśnictwa koordynowałem i prowadziłem zajęcia z takich przedmiotów jak:

- Fitopatologia (rolnictwo)
- Środki ochrony roślin (rolnictwo)
- Doradztwo w ochronie roślin (rolnictwo)
- Odporność agrofagów na środki ochrony roślin (rolnictwo)
- Środki ochrony roślin i systemy wspomagania decyzji w precyzyjnej ochronie (rolnictwo)
- Metody ochrony roślin z herbologią (architektura krajobrazu)
- Biologiczne metody ochrony drzew (leśnictwo)
- Zoologia leśna (leśnictwo)

Współprowadzenie Studenckiego Koła Naukowego „Pasikonik"

Prace **4.A.14. i 4.A.22. (Załącznik 4)** powstały przy współpracy ze studentami należącymi do Koła Naukowego Entomologów „Pasikonik" prowadzonego przez dr hab. Agnieszkę Kosewską, prof. UWM. W tych nowatorskich badaniach larwy mącznika młynarka (*Tenebrio molitor*) żerowały i biotransformowały plastiki. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że larwy tego owada posiadają endosymbionty przyczyniające się nie tylko do degradacji polistyrenu i polietylenu, ale też biorą udział razem z mikrobiotą eukariotyczną w przemianach azotu, co sprawia, że larwy mogą przeżyć dłużej na tak niekorzystnej diecie. Obie prace zostały opublikowane w czasopismach z wysokim wskaźnikiem IF i są chętnie cytowane przez innych naukowców. Dalsza perspektywa badań opiera się na wykorzystaniu biotransformowanych plastików będących

odchodami owadzimi oraz sprawdzenie bezpieczeństwa uzyskanej biomasy larw na cele paszowe lub nawozowe. Kolejnym krokiem, była współpraca z dr hab. Jackiem Katzerem, prof. UWM (Centrum Inżynierii Lądowej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie) i dr Pauliną Żeliszewską z Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN w Krakowie, która zaowocowała użyciem larw mącznika młynarka do utylizacji styropianu pozostałego z rozbiórki budynków **(Załącznik 4; 4.A.23.)**. W skład hodowli i opracowywanych prac naukowych wchodzi też drewnojad (*Zophobas morio*), którego zastosowanie daje duży potencjał w obróbce produktów lignocelulozowych. We współpracy z Kołem Naukowym byłem współautorem wyników badań zaprezentowanych na konferencjach **(Załącznik 4; 7.33., 7.35., 7.36., 7.37., 7.38. i 7.44.)**.

Drony do wykorzystania przemysłowego

Zdobyte umiejętności w zakresie wykorzystani dronów do celów przemysłowych przedstawiam na zajęciach z doradztwa w ochronie roślin. Wraz z wykorzystaniem specjalistycznych programów komputerowych podnosi to kompetencje studentów na rynku pracy dopasowując ich sylwetki do aktualnego zapotrzebowania specjalistów w branży rolnictwa precyzyjnego.

Ponadto:

- Od czterech lat pełnię rolę Opiekuna Roku kierunku Leśnictwo.
- Jestem współautorem skryptu dydaktycznego „Zeszyt do ćwiczeń z fitopatologii”
- Byłem promotorem 7 pracy inżynierskiej.
- Byłem promotorem pomocniczym dwóch prac doktorskich.

7. Pozostałe informacje

Byłem promotorem pomocniczym mgr inż. Olgi Kosewskiej w pracy doktorskiej zatytułowanej „Wybrane właściwości chemiczne ziarniaków zbóż wpływające na strukturę mikrobiomu i aktywność metaboliczną kapturnika zbożowca i wołka ryżowego” Moim zadaniem było pokierowanie pracami doktorantki w zakresie wykonania analiz metagenomowych i biochemicznych endosymbiontów bakteryjnych owadów. Ważne wyniki badań przydatne w walce ze szkodnikami magazynowymi przedstawia praca **4.A.30. (Załącznik 4)**, w której zidentyfikowany jest endosymbiont wołków (*Sitophilus* spp.), a mianowicie bakteria *Sodalis pierantonius*. Mikroorganizm ten rozwija się dominując

w układzie pokarmowym owada tylko w określonej fazie rozwoju wołka, czyli w „młodych" osobnikach dorosłych produkując substancje niezbędne do dalszego rozwoju. Prace nad detekcją szkodników, analizą mikrobioty endosymbiotycznej i ochroną przed owadzimi szkodnikami magazynowymi są też realizowane w szerszym zakresie. Dodatkowym elementem była realizacja przez doktorantkę projektu NCN Preludium, w którym pełniłem funkcję wykonawcy. Efektem współpracy z doktorantką i promotorem (dr hab. Mariuszem Nietupskim, prof. UWM) są też liczne wystąpienia na konferencjach naukowych **(Załącznik 4; 7.39., 7.41., 7.42. i 7.44.)** oraz inne publikacje naukowe będące kontynuacją przewodu doktorskiego (**Załącznik 4; 4.A.36, 4.A.38. 4.A.40**). Dodatkowo dzięki wiedzy, którą nabyłem na stażu naukowym w Zakładzie Wirusologii i Bakteriologii Instytutu Ochrony Roślin-Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu, dotyczącemu analizy RT Real-Time PCR (załącznik 6), wykonaliśmy z Doktorantką badania dotyczące ekspresji stresu owadów, które zostały opublikowane w prestiżowym czasopiśmie naukowym (**Załącznik 4; 4.A.45**).

Pełniłem też funkcję promotora pomocniczego mgr inż. Marty Borsuk-Stanulewicz w rozprawie doktorskiej zatytułowanej **„**Wpływ dodatków o różnych mechanizmach hamowania proteolizy na skład frakcji białkowych, mikrobiom kiszonek oraz rozkładalność żwaczową białka lucerny". Moim zadaniem było pokierowanie pracami doktorantki w zakresie wykonania analiz metagenomowych oraz real time PCR wraz z pomocą przy interpretacji wyników. Niniejsze badania są też elementem zrealizowanego projektu NCN, w którym pełniłem funkcję wykonawcy. Efektem współpracy z doktorantką i promotorem (prof. dr hab. Cezarym Purwinem) są też prezentacje wyników wspólnych badań naukowych na konferencjach zagranicznych **(Załącznik 4; 7.49., 7.50.)** oraz publikacje naukowe **(Załącznik 4; 4.A.19. i 4.A.31.)**.

Ponadto:

- Zakończyłem z sukcesem projekt NCN Miniatura 3.
- Zakończyłem z sukcesem projekt „Grant Rektora 2".
- Realizuję badania „Grant na grant" w ramach projektu „Regionalna Inicjatywa Doskonałości" 2025.
- Jestem koordynatorem działań w ogólnopolskim projekcie „Nestle dla nauki".

- Jestem konsorcjantem w projekcie OPUS NCN „Czy biowęgiel wpływa na mikrobiotę jelitową i zrównoważony rozwój czarnej muchy?”, Kierownik: dr Piotr Bulak, Instytut Agrofizyki, Lublin..
- W latach 2022-2025 co roku przyznawano mi nagrodę Rektora za osiągnięcia naukowe, które w dużej mierze zawdzięczam kooperacji z innymi jednostkami naukowymi.



……..……..…….

(podpis wnioskodawcy)