

Prof. dr hab. Ewa Solarska
Kierownik Pracowni Żywności Ekologicznej
w Katedrze Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka
Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie
ul. Skromna 8, 20-704 Lublin

Recenzja rozprawy doktorskiej pt. „Charakterystyka molekularna i metaboliczna termoopornych grzybów *Neosartorya* wyizolowanych z gleby i owoców truskawki” wykonanej przez Panią mgr Ninę Bilińską-Wielgus w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Magdaleny Frąc

Pracę doktorską wykonano na podstawie badań przeprowadzonych w ramach projektu „Występowanie, detekcja oraz charakterystyka molekularna i metaboliczna toksynotwórczych grzybów termoopornych (*Neosartorya fischeri* i *Byssochlamys fulva*)” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Praca wpisuje się w nurt badań realizowanych w ostatnich latach w Zakładzie Badań Systemu Gleba-Roślina pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Magdaleny Frąc związanych m. in. z wykorzystaniem metod biologii molekularnej do wykrywania grzybów termoopornych. Oceniana rozprawa podejmuje ważny temat pod względem naukowym oraz zawiera duży potencjał zastosowań praktycznych z zakresu mikologii i biotechnologii. Gatunki z rodzaju *Neosartorya* należą do najczęściej występujących grzybów termoopornych będących teleomorficznymi formami grzybów z rodzaju *Aspergillus*. Ze względu na odporność askospor na wysoką temperaturę mogą one przetrwać proces pasteryzacji i rozwijać grzybnię w przetworzonych produktach. Takie produkty ulegają zepsuciu i stają się toksyczne wskutek tworzenia przez te grzyby mykotoksyn. Niezwykle ważne są zatem szybkie i precyzyjne metody identyfikacji gatunkowej grzybów termoopornych w glebie i w owocach, aby wyeliminować partię skażonych owoców z przetwórstwa i podjąć działania prowadzące do zmniejszenia populacji tych grzybów w glebie. Cel badań został jasno sformułowany i dotyczył określenia występowania grzybów termoopornych z

rodzaju *Neosartorya* w glebach i owocach truskawki z plantacji zlokalizowanych w 17 miejscowościach woj. lubelskiego i mazowieckiego, identyfikacji wyizolowanych grzybów *Neosartorya* spp. na podstawie obserwacji morfologicznych, a następnie identyfikacji tych grzybów do gatunku oraz określenie ich zmienności genetycznej za pomocą metod biologii molekularnej. Ważnym celem pracy była także charakterystyka metaboliczna losowo wybranych izolatów grzybów *Neosartorya* spp. oraz określenie wrażliwości chemicznej dwóch szczepów w obrębie gatunku *Neosartorya fischeri*.

Rozprawa doktorska zawiera wszystkie formalnie wymagane części i obejmuje 179 stron maszynopisu, w tym 53 rysunki i 15 tabel oraz 229 pozycji literatury i stanowi przejrzystą i estetyczną całość. Z ostatnich pięciu lat pochodzi ok. 20% cytowanych pozycji piśmiennictwa. W przeglądzie literatury doktorantka przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat grzybów termoopornych, ze szczególnym uwzględnieniem grzybów z rodzaju *Neosartorya*, opisując poza cechami taksonomicznymi, produkowane przez nie metabolity wtórne oraz wyjaśniając istotę wytrzymałości askospor. Szczegółowo została również opisana diagnostyka grzybów termoopornych z podziałem na metody klasyczne i biologii molekularnej. W charakterystyce metabolicznej grzybów termoopornych autorka podała metody badań ich termooporności i wrażliwości chemicznej oraz wskazała na profil kataboliczny jako jeden ze sposobów identyfikacji tych mikroorganizmów. Obszerność cytowanej części świadczy o bogatej wiedzy teoretycznej mgr Niny Bielińskiej-Wielgus, a wyodrębnienie rozdziałów i podrozdziałów czyni tę część uporządkowaną i czytelną.

Realizując zaprogramowane badania doktorantka wyizolowała grzyby termooporne z gleby i truskawki badanych plantacji, a następnie dokonała selekcji grzybów z rodzaju *Neosartorya*, i co jest bardzo istotne przeprowadziła ocenę występowania tych grzybów w zależności od źródła izolacji tj. gleby i owoców, a także w zależności od typu gleby. W trzecim etapie badań obejmującym charakterystykę molekularną i metaboliczną grzybów *Neosartorya* spp. doktorantka przeprowadziła identyfikację genetyczną dwoma sposobami tj. na podstawie analizy sekwencji nukleotydowych, dwóch markerów genetycznych: odcinka D2 zlokalizowanego w obrębie genu kodującego dużą podjednostkę rybosomu (D2 LSU) oraz regionu wewnętrznych sekwencji niekodujących ITS. Profile metaboliczne badanych grzybów określono na podstawie analizy substratów węglowych zawartych w płytkach Biolog FF. Określono również katabolizm substratów węglowych w zależności od warunków hodowli grzybów z rodzaju *Neosartorya*. Jedną z ważnych informacji

uzyskanych podczas badań było stwierdzenie częstszego występowania badanych grzybów w truskawkach uprawianych na glebie brunatnej kwaśnej i torfie niskim co według autorki ma związek z niskim pH tych gleb, a kwaśny odczyn jest korzystny dla rozwoju grzybów. Trafną decyzją doktorantki okazało się zastosowanie dwóch markerów genetycznych do identyfikacji gatunkowej wybranych izolatów grzybów z rodzaju *Neosartorya*, gdyż tylko za pomocą sekwencjonowania fragmentu ITS było możliwe prawidłowe przyporządkowanie ich do gatunku. Zestawienie wyników różnorodności genetycznej z wynikami różnorodności funkcjonalnej badanych izolatów wskazało na brak powiązania między tymi formami różnorodności biologicznej co autorka wyjaśnia różnicowaniem ekologicznym lub adaptacją do różnych siedlisk. Dużym osiągnięciem autorki jest wykazanie, że termooporność askospor wybranych izolatów *Neosartorya* spp. w przetworach z truskawek rośnie wraz ze wzrostem zawartości cukru, czyli zarówno sacharoza jak i fruktoza dodatkowo chroni askospory przed inaktywacją termiczną. Wzrost występowania grzybów w glebie wyjaśnia się zmieniającymi warunkami klimatycznymi i odpornością grzybów na fungicydy powszechnie stosowane w rolnictwie. Doktorantka uznała więc za wskazane przeprowadzenie badań, mających na celu znalezienie efektywnych związków, które mogłyby być stosowane przeciw *N.fischeri*. Spośród badanych licznych związków, hamującymi wzrost grzybni dwóch testowanych izolatów tego gatunku okazały się trzy, w tym dwa uznane za bezpieczne. Również w przypadku badań wrażliwości chemicznej testowanego gatunku zastosowano dwie metody i właściwsza okazała się jedna z nich tj. panel mikroplitek PM firmy Biolog. Metoda ta była mniej pracochłonna i szybsza od metody tradycyjnej i autorka poleca ją jako bardzo przydatną w badaniach przesiewowych wrażliwości chemicznej grzybów termoopornych. Doktorantka stwierdza także, że otrzymane wyniki czułości chemicznej tych grzybów mogą zostać wykorzystane do zaprojektowania lepszych metod zapobiegania występowaniu *N.fischeri* oraz do stworzenia nowych związków aktywnych do fungicydów przeznaczonych do zwalczania tego gatunku. **Dlaczego doktorantka uwzględniła w badaniach wrażliwości chemicznej tylko gatunek *N.fischeri* skoro licznie izolowano z owoców truskawki i z gleby inne gatunki z rodzaju *Neosartorya*?** Należałoby rozważyć, czy chemiczne zwalczanie grzybów bytujących w glebie i owocach to jedyny, możliwy kierunek przyszłych badań. Otóż fungicydy ograniczają wzrost nie tylko docelowych grzybów, ale również innych grzybów występujących w określonym środowisku, spośród których mogą występować antagoniści grzybów szkodliwych i w przypadku niecałkowitego zwalczania tych grzybów będą one mogły bez

przeszkód ponownie się rozwijać, zwłaszcza przy braku czynników ich ograniczających. Ponadto stosowanie środków chemicznych, niesie ryzyko wystąpienia na nie odporności u grzybów, co podkreślono również w pracy. Informacje z literatury wskazują także, że intensywne nawożenie syntetyczne, głównie azotowe zmniejsza liczebność bakterii w glebie, w tym antagonistycznych w stosunku do grzybów szkodliwych, a zwiększa liczebność grzybów m.in. z rodzajów *Penicillium* i *Aspergillus*. **Jakie więc inne metody powinny być uwzględnione w planowanych badaniach mających na celu ograniczanie grzybów termoopornych?**

Doktorantka potwierdziła zgodnie z założoną hipotezą badawczą istnienie zróżnicowania metabolicznego i genetycznego grzybów *Neosartorya* spp. w zależności od rodzaju próbki, z której wyosabniano izobaty. Dwukrotnie większą liczbę wykorzystywanych substratów przez grzyby z tego rodzaju wyizolowane z gleby w stosunku do wyosobnionych z owoców truskawki autorka wytłumaczyła większą dostępnością zróżnicowanych związków występujących w środowisku glebowym w stosunku do ich ograniczonej liczby w owocach. Różnice te potwierdzono w badaniach genetycznych gdyż dendrogramy wykonane na podstawie profilu genetycznego wskazały że grzyby wyizolowane z dwóch różnych środowisk tworzyły odrębne klastry. Doktorantka pod kierunkiem wysokiej klasy naukowca jakim jest Pani prof. dr hab. Magdalena Frąc miała doskonałą możliwość opanować warsztat badawczy z dziedziny mikologii i biotechnologii i biorąc pod uwagę zastosowane w pracy metody badawcze oraz uzyskane wyniki wykorzystwała tę możliwość bardzo dobrze. Doktorantka podjęła się bowiem zadania przeprowadzenia bardzo ambitnych i pracochłonnych badań wymagających znajomości i dużych umiejętności metod biologii molekularnej. Są to badania nowoczesne, wymagające odpowiedniego przygotowania i dobrze wyposażonego laboratorium, wnoszące nowe wartości do literatury światowej.

Podobnie jak w przypadku przeglądu piśmiennictwa dyskusja jest bardzo interesująca, konkretna, bez dłużyzn i umiejętnie oraz przekonująco uzasadnia celowość przeprowadzenia badań dotyczących problematyki, którą zajęła się doktorantka w ramach rozprawy doktorskiej.

Rozprawa pani mgr Niny Bilińskiej-Wielgus posiada też drobne mankamenty, z których najważniejsze pozwolę sobie przytoczyć.

Autorka wymienia często nazwę rodzajową grzybów jako grzyby *Neosartorya* i jeśli nie jest ona poprzedzona sformułowaniem „grzyby z rodzaju”, powinno się umieścić przy tej

nazwie skrót spp. oznaczający wszystkie lub różne gatunki z danego rodzaju. Nie powinno się wymieniać w liczbie mnogiej określenia grzyb w przypadku jednego gatunku. Prawidłowe nazewnictwo to grzyb *N. fischeri* lub gatunek *N. fischeri*. Określenie „grzyby *N. fischeri*” lub „grzyby tego gatunku” jakie stosuje autorka sugeruje z góry różnicowanie wewnątrzgatunkowe. Niewłaściwe są stosowane w pracy sformułowania „badania donoszą” lub „literatura donosi”. Można je zastąpić określeniami „wyniki badań wskazują na..” i „informacje z piśmiennictwa wskazują na..”.

Na str. 137 zdanie „W ostatnich latach występowanie zakażeń pleśni wzrosło” oznacza że wzrosło zakażenie grzybów, a intencją autorki było stwierdzenie, że wzrosło występowanie zakażeń roślin przez pleśnie, co wynika z kontekstu całego zdania i kolejnych.

Na str.152 w 25 pozycji literatury brakuje roku wydania.

W tekstach naukowych nie powinno się używać określeń takich jak „co więcej”, czy „z kolei”.

- w pracy jest sporo drobnych błędów edytorskich, które zostały zaznaczone w tekście.

Kończąc ocenę rozprawy chcę podkreślić, że podjęte przez panią mgr Bilińską-Wielgus zadania badawcze zostały wykonane prawidłowo zgodnie z przyjętą metodyką. Praca wnosi nowe elementy do poznania zróżnicowania genetycznego i metabolicznego termoopornych grzybów z rodzaju *Neosartorya*. Prowadząc badania doktorantka wykazała się znajomością kilku najnowocześniejszych metod z zakresu biologii molekularnej.

Stwierdzam więc, że oceniana praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN o dopuszczenie pani Niny Bilińskiej-Wielgus do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Stawiam ponadto wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej nagrodą ze względu na kompleksową charakterystykę molekularną i metaboliczną termoopornych grzybów z rodzaju *Neosartorya* i duże znaczenie praktyczne uzyskanych w pracy wyników badań.


Prof. dr hab. Ewa Solarska