

Warszawa, 08.11. 2018r.

dr hab. Ewa Beata Górka,  
prof. nadzw. SGGW  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego  
Wydział Rolnictwa i Biologii  
ul. Nowoursynowska 166  
02-787 Warszawa

**RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**  
**mgr NINY BILIŃSKIEJ-WIELGUS**  
**PT.: „CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA I METABOLICZNA**  
**TERMOOPORNYCH GRZYBÓW *NEOSARTORYA* WYIZOLOWANYCH Z GLEBY**  
**I OWOCÓW TRUSKAWKI”**

**wykonanej w Instytucie Agrofizyki im. Bogdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii**  
**Nauk w Lublinie, pod kierunkiem pani prof. dr hab. Magdaleny Frąc.**

**ZNACZENIE PODJĘTEJ TEMATYKI BADAWCZEJ**

W przedstawionej do recenzji rozprawie podjęto badania nad charakterystyką (molekularną i metaboliczną oraz występowaniem w glebie i na owocach truskawki, oraz w owocach) grzybów z rodzaju *Neosartorya*, których askospory podobnie jak *Byssoschlamys* sp., oraz *Talaromyces* sp. wykazują oporność na proces pasteryzacji i obecnie są uważane za najbardziej niezniszczalne struktury eukariotyczne.

W świetle przeprowadzonych dotychczas badań wiadomo, że grzyby *Neosartorya* sp. występują w glebie i kolonizują nisko rosnące, mające kontakt z glebą owoce np. truskawki. Dzięki wytwarzaniu termoopornych askospor, grzyby *Neosartorya* sp. mogą przetrwać proces pasteryzacji przemysłowej, czego konsekwencją jest wzrost grzybni w produktach owocowych uzyskanych w wyniku procesu termicznej obróbki przetwarzanych owoców. Czynnikiem potęgującym pogarszanie się walorów organoleptycznych produktu jest również możliwość rozwoju *Neosartorya* sp. przy niskim potencjale oksydo-redukcyjnym środowiska, jaki panuje w opakowanych hermetycznie przetworach, oraz syntezy przez grzyby enzymów hydrolitycznych (w tym pektynolitycznych). Grzyby *Neosartorya* sp. kolonizując

przetworzone produkty owocowe, syntetyzują w nich odporne na wysoką temperaturę mykotoksyny, które działają negatywnie na organizm ludzki (mutagennie, teratogennie, kancerogennie).

W związku z powyższym, podjęte przez Doktorantkę badania, które przeprowadziła w ramach projektu SONATA 4: "Występowanie, detekcja oraz charakterystyka molekularna i metaboliczna toksynotwórczych grzybów termoopornych (*Neosartorya fischeri* i *Byssoschlamys fulva*)", finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, są w pełni uzasadnione, zarówno ze względu merytorycznego, jak i aplikacyjnego. Temat rozprawy jest aktualny i wychodzi naprzeciw potrzebom przemysłu owocowo-warzywnego i rolnictwa. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań mogą być zastosowane między innymi w opracowaniu preparatów do walki z grzybami termoopornymi *Neosartorya* sp.

### **OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

Recenzowana dysertacja zawiera 179 stron maszynopisu, 229 pozycji literatury cytowanej, 53 rysunki i 15 tabel oraz 6 tabel zamieszczonych w załączniku. Manuskrypt podzielony jest na 9 rozdziałów („Przegląd literatury”, „Cele i hipotezy badawcze”, „Materiały i metody”, „Wyniki”, „Dyskusja”, „Podsumowanie i wnioski”, „Spis rysunków i tabel”, „Literatura”, „Załącznik- schemat płytek Biolog”). Poprzedzone są one „Streszczeniem” w języku polskim i angielskim. Przegląd literatury opisuje bardzo obszernie bieżący stan wiedzy dotyczący grzybów termoopornych *Neosartorya* sp. i ich diagnostyki w oparciu o metody klasyczne i biologii molekularnej. Cel pracy i hipotezy sformułowano jasno i przejrzysto.

Rozdział „Materiały i metody” liczy 21 stron maszynopisu, opisany jest szczegółowo i wyczerpująco. Autorka opisuje w nim zastosowane w badaniach metody.

Doktorantka przedstawiła obszerne opracowanie wyników badań na 65 stronach maszynopisu (str.66 - 131) oraz ich dyskusję na 10 stronach (str. 131- 142), co nie jest zaznaczone precyzyjnie w „Spisie treści”, wręcz rozdział „Dyskusja”, podobnie jak i rozdział „Podsumowanie i wnioski” są w nim pominięte.

### **SZCZEGÓŁOWA OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

Streszczenie dysertacji, oraz aktualny stan wiedzy opisany bardzo starannie w „Przeglądzie literatury” wprowadza czytelnika w tematykę badań, a nie rozdział „Wstęp”, którego Autorka nie zamieściła w maszynopisie rozprawy.

Przegląd literatury jest podzielony na dwie części: pierwsza z nich opisuje morfologię grzybów *Neosartorya* sp. i syntezę przez nie metabolitów wtórnych, oraz istotę wytrzymałości askospor na niekorzystne czynniki środowiska. Druga część tego rozdziału prezentuje metody klasyczne, w tym wybrane cechy biochemiczne, takie jak: termooporność, profil kataboliczny, wrażliwość chemiczną i metody oparte na technikach biologii molekularnej stosowane w diagnostyce grzybów termoopornych. Uważam, że pierwsza część „Przeglądu literatury” powinna zawierać również opis cech biochemicznych *Neosartorya* sp., dotyczących możliwości metabolizowania przez te grzyby różnych związków chemicznych, jako źródła węgla i energii, oraz zdolność tych grzybów do zasiedlania powierzchni i wnętrza organów roślinnych (endofity, mikroorganizmy tworzące ryzosferę i fyllosferę). Informacje te dałyby szerszy pogląd na funkcje jakie grzyby termooporne *Neosartorya* sp. mogą pełnić w środowisku, oraz ich znaczenie dla rolnictwa i ogrodnictwa.

Podrozdział „Metabolity wtórne” opisuje związki chemiczne syntetyzowane tylko przez *N. fischeri* oraz *N. glabra* pomimo, iż Autorka prowadziła badania również nad *N. laciniosa*, *N. assulata*.

Prosiłabym Doktorantkę, o uzupełnienie informacji dotyczących wyjaśnienia tej kwestii podczas obrony rozprawy.

Doktorantka w pierwszej części „Przeglądu literatury” opisała bardzo szczegółowo morfologię grzybów, oraz znaczenie obecności w askosporach *Neosartorya* sp. mannitolu, trehalozy i innych oligosacharydów dla przeżywania ekstremalnych warunków środowiska.

Metody detekcji grzybów *Neosartorya* sp. opisane są bardzo dokładnie, co czyni rozprawę rzetelnym źródłem sprawdzonych metod dla zainteresowanych diagnostyką grzybów pleśniowych.

Cel rozprawy jest jasno sprecyzowany, jednak brak pewnej konsekwencji pomiędzy tytułem rozprawy, a celem nadrzędnym. Badania Autorki dotyczyły nie tylko charakterystyki molekularnej i metabolicznej *Neosartorya* sp., jak również ich występowania w glebie i na powierzchni truskawek i w owocach, oraz izolacji. Uwzględniając wszystkie podjęte przez Autorkę badania tytuł rozprawy zmieniałabym, dla przykładu- na następujący: „Charakterystyka termoopornych grzybów *Neosartorya* sp. wyizolowanych z gleby i owoców truskawki”. Wówczas, podany przeze mnie przykładowy tytuł rozprawy odniósłby się do wyników wszystkich badań opisanych w rozprawie, natomiast obecny odzwierciedla tylko drugą część nadrzędnego celu pracy.

Rozdział „Materiały i metody” napisany jest bardzo przejrzyście, jednak mam odczucie jakby Autorka więcej uwagi poświęciła metodom biologii molekularnej, niż złudnym i

bardzo pracochłonnym, wymagającym ogromnej wiedzy i doświadczenia laboratoryjnego technikom mikrobiologii klasycznej, które dla mikrobiologów środowiskowych (w tym mykologów), jak również dla mnie są równie istotne, co identyfikacja genetyczna.

Prosiłabym aby Autorka podczas obrony pracy doktorskiej uzupełniła informacje metodyczne (rozdział 3.1.), które dotyczą terminu (rok, miesiąc) i liczby pobieranych próbek gleby, oraz owoców truskawki w każdej spośród 17 miejscowości, z których izolowano *Neosartorya* sp. Proszę także podać jakie odmiany roślin truskawki były wybrane do badań.

Proszę wyjaśnić, na czym polegała modyfikacja własna metody wg Houbraken'a i Samson'a (2006) dotycząca oceny występowania grzybów termoopornych w badanych próbkach (rozdział 3.1.).

Doktorantka wymieniając podłoża mikrobiologiczne PDA (potato-dextrose agar) i MEA (Malt Extract Agar), które zastosowała do oceny występowania i izolacji grzybów *termoopornych* nie wymienia zastosowanych czynników stanowiących o ich selektywności, między innymi dodatku antybiotyków bakteriobójczych, które są niezbędne do eliminacji bakterii sporowych z rodzaju *Bacillus*, czy *Clostridium* sp. podczas prowadzenia hodowli grzybów na wymienionych podłożach. Endospory tych bakterii, podobnie jak askospory *Neosartorya* sp. przeżywają szok termiczny w temperaturze 80°C (nawet w 100°C) przez 30 minut, któremu były poddawane próbki wykorzystane do oznaczania występowania i izolacji grzybów termoopornych, o czym sama przekonałam się prowadząc badania nad występowaniem i izolacją z gleby *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., oraz *Clostridium* sp.

Prosiłabym o uzupełnienie brakujących informacji podczas obrony pracy doktorskiej.

Godny podkreślenia jest fakt, że Autorka rozprawy wyizolowała z badanych próbek aż 785 izolatów grzybów termoopornych, które wstępnie sklasyfikowała do *Neosartorya* sp. Chcę zaznaczyć, że izolacja i wstępna diagnostyka grzybów z zastosowaniem technik mikrobiologii klasycznej wymaga nie tylko dużej wiedzy, oraz doświadczenia laboratoryjnego, ale jest bardzo żmudnym, pracochłonnym i czasochłonnym zajęciem.

Informacje przedstawione w tabeli 6 nie są spójne z podrozdziałem 3.3.1., w którym Doktorantka podaje, że identyfikację genetyczną 42 izolatów przeprowadziła na podstawie analizy sekwencji nukleotydowych dwóch markerów genetycznych: odcinka D2 i regionu ITS. Zgodnie z tabelą 6, obie analizy były wykonane tylko dla 30 izolatów, dopiero zapoznając się z wynikami badań stwierdzamy, że jednak wyniki dotyczyły aż 42, a nie 30 izolatów.

Doktorantka w rozprawie „Materiały i metody” (3.3.2.) nie podaje precyzyjnie, czy materiał genetyczny był wyekstrahowany z grzybni, czy z askospor? – proszę o wyjaśnienie.

Autorka rozprawy w rozdziale 3.4.2. zaznacza, że cyt. ”Szczegółowe informacje dotyczące badanych izolatów *Neosartorya* znajdują się w tabeli 7”, jednak tabela ta opisuje informacje dotyczące warunków reakcji amplifikacji genu D2 badanych grzybów, a nie charakterystyki izolatów.

Wyniki badań zostały opisane w sposób pełny, a co ważniejsze uporządkowany i przejrzysty. Odpowiednio dobrane tabele i rysunki zawierają pełne dane uzyskane w wyniku przeprowadzonych eksperymentów, które w większości Autorka zweryfikowała analizami statystycznymi. Czytelnik nie ma trudności w prawidłowym odczytaniu wyników, co więcej Autorka umiejętnie wyszukuje i wskazuje dostrzeżone tendencje i prawidłowości.

Podrozdział 1.2.3. (powinno być 4.4.2.- str. 117) opisuje wyniki (rys.44 do rys. 53), które Doktorantka opublikowała wraz ze Współautorami w 2016 roku w czasopiśmie *Plos One* [11(1): e0147605]. Stwierdzam, że umieszczenie przez Doktorantkę w rozprawie wyników wcześniej opublikowanych, podnosi wartość naukową przeprowadzonych przez Nią badań. Zapewne, osoby ze środowisk naukowych w kraju i za granicą wiedzą doskonale, że w czasopismach o wysokiej randze naukowej, a do takich właśnie zaklasyfikowane jest czasopismo *PlosOne* (IF<sub>2016</sub> 2,806), umieszczane są tylko artykuły nowatorskie, o wysokiej randze naukowej, których wyniki badań wykonane są najnowocześniejszymi metodami badawczymi.

Podczas czytania rozprawy nasuwają się pewne pytania, np. jak Autorka może zinterpretować fakt, że nie stwierdzono występowania grzybów *Neosartorya* sp. w owocach truskawki pochodzących z miejscowości Przykwa, których plantacja była założona na glebie płowej, podobnie jak plantacje zlokalizowane w miejscowościach Jakubówka, czy Kolechowice?

Wyniki badań określające różnice w przeżywalności askospor izolatów w temp. 80° C i 95° C (rys.16) powinny być zweryfikowane analizą statystyczną, podobnie wyniki prezentowane na rys. 18 i 19. Jeśli te wyniki nie były poddane analizie statystycznej, to trudno jest wyciągać wnioski cyt. „, Temperatura 95°C była na tyle wysoka, że większość askospor uległa inaktywacji i nie zaobserwowano wyraźnych różnic pomiędzy badanymi wariantami” (rys.19).

Autorka opisuje bardzo dokładnie związki, które są metabolizowane przez badane izolaty, jednak wśród nich są takie jak: urydyna, N-acetylo-D-galaktozamina, glukuronamid, kwas glicylo-L-glutaminowy i inne, które hamowały wzrost mikrogrzybów.

Proszę o wyjaśnienie, co może być powodem zahamowania wzrostu grzybów przez wymienione związki chemiczne?

Identyfikacja przynależności izolatów do gatunku wykonana na podstawie analizy sekwencji regionu ITS wykazała, że uzyskane przez Autorkę grzyby należą do gatunku *N.glabra*, *N.laciniosa*, *N.assulata*, a nie do *N.fischeri*.

Proszę w związku z tym wyjaśnić dlaczego pomimo tego faktu, Autorka oznaczyła wpływ związków chemicznych na *Neosartorya* sp., tylko na przykładzie *N.fischeri*.

Za najważniejsze osiągnięcie Autorki uważam dokładne przeanalizowanie cech biochemicznych i genetycznych izolatów *Neosartorya* sp. wyodrębnionych z różnych typów gleb i owoców truskawki. Istotnym było zbadanie wpływu toksycznych związków chemicznych na wzrost *Neosartorya* sp. Autorka również wykazała, że spośród przebadanych toksycznych związków chemicznych, tylko selenian sodu, oraz kwas zaragozowy mogą być wykorzystane jako substancje aktywne fungicydów przeciwko *N.fischeri*, ponieważ są one toksyczne dla badanego gatunku grzyba, ale nie dla ludzi.

Wyniki są umiejętnie przedstawione i porównane na tle bogatej literatury, która prezentuje najnowszy stan wiedzy. Sposób wykorzystania wyników przeprowadzonych badań świadczy o dużej wiedzy Autorki i jej dojrzałości jako badacza. Precyzyjne przedstawienie, oraz analiza uzyskanych danych pozwoliła Doktorantce na wyciągnięcie uprawnionych wniosków.

Podsumowując można stwierdzić, że wybrany kierunek badań jest nader interesujący. Po pierwsze z naukowego punktu widzenia, ponieważ pozwala on na uzyskanie nowych, cennych informacji na temat cech biochemicznych i genetycznych izolatów *Neosartorya* sp. wyizolowanych z różnych typów gleb i owoców truskawki. Bardzo istotnym było zbadanie wpływu różnych toksycznych związków chemicznych na wzrost *Neosartorya* sp. Otrzymane wyniki badań poszerzają wiedzę na temat funkcji jaką termooporne grzyby mikroskopowe pełnią w ekosystemach glebowych, w tym jak typ gleby oraz pochodzenie próbki (gleba, owoce truskawki) mogą kształtować metabolizm *Neosartorya* sp.

Po drugie- obok wartości poznawczych, wyniki badań mogą znaleźć zastosowanie praktyczne. Dogłębna znajomość mikroorganizmów glebowych nie tylko umożliwi celowe i świadome kształtowanie procesów przemiany substancji organicznej w glebie i działanie w kierunku wzrostu jej żyzności, lecz także pozwoli przyjrzeć się możliwości opracowania fungicydów do wagi z grzybami *Neosartorya* sp.

Wyniki badań prezentowane w rozprawie, również mogą być przydatne dla producentów przetworów owocowych. Powodem tego jest fakt, że Autorka wykazała w jakich warunkach środowiska termooporność askospor *Neosartorya* sp. jest mniejsza, a kiedy ulega zwiększeniu, co producenci mogą wykorzystać opracowując sposoby przetwarzania owoców.

### OCENA EDYTORSKIEJ STRONY ROZPRAWY

Z obowiązku Recenzenta muszę odnieść się do pewnych mankamentów, niefortunnych sformułowań, czy tzw. literówek, które znalazły się w tekście, jednak nie mają istotnego wpływu na stronę merytoryczną pracy i na odbiór czytanego tekstu.

Poniżej niektóre z nich:

- Spis treści- brak wymienionych podrozdziałów: „Dyskusja”, „Podsumowanie i wnioski”;
- w tytule pracy, jak również w tekście (str. 84, 88, 89, 94, 97 i in.)- napisane jest „*Neosartorya*” powinno być *Neosartorya* sp. lub *Neosartorya* spp.;
- str.18 „*Pazizomycotina*” zamiast *Pezizomycotina*;
- str 19, 23, 24, 25, 33, 64 i in. pisane błędnie lub wymiennie terminy „klejstotecja mają ...” powinno być kleistotecja (l.mn), ponieważ termin klejstotecjum dotyczy liczby pojedynczej;
- Tytuły pod rysunkami od nr 2 - nr 5, powinny zawierać dokładny opisy skrótów, które odpowiadają podłożom hodowlanym (np. OA- oat agar, MEC-agar with maltose extract), podobnie w tabeli nr 3.
- str. 21 „(tabela 2) zamiast (tabela nr 3)
- Tab. nr 3 jest zdublowana (str. 26 i 27)
- str. 35-„bromkiem” zamiast bromkiem;
- str. 62 –„mieszanka gazów anaerobowych” powinna być, albo napisana nazwa ang. Anaerobic gas mixture, jednak najodpowiedniejsza byłaby nazwa polska- „mieszanina gazów obojętnych”;
- 11 artykułów cytowanych w tekście nie znalazło się w Spisie literatury:
  - str. 11- Ściborek-Rycyk, 2016;
  - str. 14- Gori i in. 1998, Takada i Udagawa- 1985, Udagawa i in. 1996;
  - str.15- Brakhage i Langfelder 2002;
  - str.21- Samson i in. 2007;
  - str 30- Patterson i in. 1981, Pattanawasin i in. 2007;
  - str.31- Wyat i in. 2015;
  - str. 47- Burnett i Hunter 1987;

## OCENA KOŃCOWA

Uważam, iż rozprawa doktorska pani mgr Niny Bilińskiej-Wielgus na temat „Charakterystyki molekularnej i metabolicznej termoopornych grzybów *Neosartorya* wyizolowanych z gleby i owoców truskawki” jest dziełem o dużej wartości naukowej i aplikacyjnej, stanowi oryginalne rozwiązanie podjętego problemu badawczego.

Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością podjętej tematyki badawczej, umiejętnością właściwego planowania i wykonywania eksperymentów z zastosowaniem do diagnostyki grzybów najnowocześniejszych technik laboratoryjnych stosowanych w ośrodkach krajowych i zagranicznych, oraz interpretacji wyników i formułowania wniosków. Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez panią mgr Ninę Bilińską-Wielgus.

**Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia w pełni wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wobec tego wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. Bogdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie o dopuszczenia pani mgr Niny Bilińskiej-Wielgus do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Ewa Beata Górka

N-49, 08-M-2012

