



UNIWERSYTET ROLNICZY

im. Hugona Kollątaja w Krakowie

Katedra Mikrobiologii

30-059 Kraków, Al. Mickiewicza 24/28

Tel.: +48 12 6624096 tel./fax: +48 12 6331356

Kraków, dnia 08 grudzień 2015 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Kucharskiej

pt.:

**„Wykorzystanie mikroorganizmów do oceny zanieczyszczeń fyllosfery
i ryzosfery środkami ochrony roślin”**

Praca wykonana w Katedrze Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej
na Wydziale Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Uniwersytetu

Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

Promotor: dr hab. Urszula Wachowska prof. UWM

Recenzja została przygotowana w odpowiedzi na pismo Pana Dziekana Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie prof. dr hab. Krzysztofa Młynarczyka, z dnia 03 listopada 2015 roku którym poinformowano mnie, że decyzją Rady Wydziału zostałam powołana na recenzentkę w/w pracy.

Problematyka badawcza

Tematyka przedstawionej do recenzji pracy mgr inż. Katarzyny Kucharskiej dotyczy niezwykle istotnego problemu potencjalnie toksycznego wpływu środków ochrony roślin na zespoły mikroorganizmów zasiedlających ryzosferę i fyllosferę roślin uprawnych tym samym wpisując się w aktualną problematykę badań związanych z analizą skutków środowiskowych stosowania pestycydów i szeroko pojętą ochroną środowiska rolniczego.

Ryzyko związane z nadmiernym stosowaniem środków chemicznych dostrzegają już nie tylko naukowcy ale także rolnicy, dlatego podejmowane są próby ograniczenia używania pestycydów i coraz prężniej rozwijają się gospodarstwa ekologiczne.

Na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci powszechne użycie w rolnictwie preparatów chemicznych z całą pewnością, przyczyniło się do wzrostu otrzymywanych plonów i ułatwiło uprawę, jednak wprowadzanie ich do środowiska niezaprzeczalnie nie pozostaje obojętne dla funkcjonowania życia biologicznego tym bardziej, że szacunkowe dane wskazują iż zaledwie 0,3 % środków ochrony roślin osiąga organizm docelowy, a pozostała część trafia do środowiska gdzie może ulegać (lub nie) biologicznej i fizykochemicznej degradacji. W konsekwencji pozostałości pestycydów mogą dostawać się do produktów spożywczych stwarzając tym samym ryzyko dla zdrowia konsumentów, dlatego też monitoring ich zawartości w glebie i wodzie jest niezbędny. Liczne badania prowadzone na świecie ukierunkowane są na poszukiwania bioindykatorów pozwalających na wiarygodną ocenę wpływu stosowanych w ochronie roślin związków chemicznych na stan środowiska naturalnego, a także na pozyskiwanie i badanie mikroorganizmów zdolnych do rozkładu toksycznych substancji - w tym pestycydów.

W związku z powyższym można stwierdzić, że badania autorki doskonale wpisują się w światowe trendy, gdyż jej doświadczenia skupiają się na ocenie presji wybranych środków ochrony roślin na mikrobiota fytosfery i ryzosfery pszenicy ozimej oraz próbie wyselekcjonowania szczepów drożdży o dużym potencjale do biodegradacji fungicydów (propikonazolu oraz azoksystrobiny).

Wartość pracy podnoszą również przeprowadzone badania ankietowe mające na celu pozyskanie informacji dotyczących sposobu przechowywania i utylizacji środków ochrony roślin w gospodarstwach rolnych i ogrodniczych na terenie północno-wschodniej Polski.

Mając na uwadze szeroki zakres analiz i ich różnorodność szczególnie doceniam duży nakład pracy doktorantki jaki został włożony w realizację badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy oraz dokumentację i analizę wyników. Pozytywnie oceniam opracowanie, które mieści się w dyscyplinie ochrona i kształtowanie środowiska.

Ocena pracy pod względem formalnym i strukturalnym

Przedstawiona do recenzji praca została przygotowana w sposób typowy dla doktorskich prac eksperymentalnych i obejmuje 154 strony maszynopisu podzielonego na dziewięć rozdziałów z podrozdziałami systematyzującymi dane teoretyczne zawarte w przeglądzie literatury, informacje na temat zastosowanych materiałów i metod badawczych, analizę wyników z badań własnych autorki oraz dyskusję. Praca zawiera również wykaz cytowanej literatury oraz abstrakty w języku polskim i angielskim.

Pod względem układu praca została przygotowana poprawnie, jest logiczna i zawiera wszystkie konieczne rozdziały we właściwej kolejności.

Pod względem formalnym opracowanie nie wzbudza zastrzeżeń jest przejrzyste i napisane w sposób poprawny językowo – nieliczne błędy stylistyczne i edytorskie nie obniżają wartości opracowania. Praca przygotowana jest ciekawie i spójnie a zgromadzone pozycje literatury zostały zacytowane poprawnie.

Wykorzystana w przygotowaniu opracowania literatura obejmuje starannie dobrane aż 302 teksty źródłowe w tym ustawy i nieliczne odsyłacze do stron internetowych. Zgromadzona literatura to głównie najnowsze publikacje obcojęzyczne oraz pozycje starsze, które niezbędne były dla prawidłowego przedstawienia analizowanego zagadnienia, zarówno od strony teoretycznej jak i praktycznej.

Wyniki badań przeprowadzonych w trakcie realizacji pracy autorka zestawiła w licznych tabelach (37) i przedstawiła graficznie aż na 62 rysunkach.

Pewien niedosyt może jednak budzić uboga dokumentacja fotograficzna - niektóre etapy badań można było udokumentować lepiej, jednak oprawa graficzna pracy jest estetyczna. Jedyne moje poważniejsze zastrzeżenie dotyczy zamieszczenia tabel, rysunków (wykresów) i fotografii na końcu pracy co zdecydowanie utrudnia analizę danych i interpretację wyników.

Ocena pracy pod względem metodycznym

W ramach części eksperymentalnej przedstawionej do recenzji pracy doktorantka wykonała szereg doświadczeń polowych, wazonowych i analiz oraz testów laboratoryjnych do których, w mojej ocenie, autorka wykorzystwała poprawne techniki badawcze chociaż metodyka nie zawsze została, moim zdaniem, wystarczająco szczegółowo opisana. W przypadku tak obszernego i złożonego doświadczenia warto było rozważyć przedstawienie go w postaci schematu, który ułatwia zrozumienie założeń i przebieg eksperymentu.

Badania zostały zaplanowane logicznie, doświadczenia polowe oraz doświadczenie wazonowe mają prawidłowy układ a terminy pobrania próbek zostały dobrane w sposób uzasadniony – bowiem dostosowano je do faz rozwojowych roślin oraz terminów zabiegów ochronnych – co jest szczególnie ważne w badaniach polowych, w których warunki atmosferyczne w sposób istotny wpływają na przebieg doświadczenia.

Szeroko zakrojone badania polowe, wazonowe i laboratoryjne wymagały od doktorantki dużego nakładu pracy, konsekwencji w działaniu i systematyczności, bowiem tego typu analizy są bardzo czasochłonne i wymagają ogromnego zaangażowania badacza.

Zgromadzone wyniki badań wykonanych w odpowiedniej liczbie powtórzeń zostały opracowane statystycznie i przedstawione w przejrzysty sposób w postaci tabel i wykresów chociaż zamieszczenie ich na końcu pracy znacznie utrudnia czytelnikowi analizę danych.

Mam jednak pewne spostrzeżenia/uwagi, dotyczące części metodycznej, wymagające wyjaśnienia:

- Choć słusznym było zamieszczenie w pracy danych meteorologicznych – jednak nie jest jasne czy doktorantka dokonywała pomiarów samodzielnie czy dane pochodziły ze stacji meteorologicznej;
- Mam istotne zastrzeżenia dotyczące liczebności bakterii z rodzaju *Azotobacter* izolowanych z fyllosfery, która wydaje się mało prawdopodobna (doświadczenie A: rys. 2.1. – 31% endofitów, rys. 2.2. – 51% epifitów; doświadczenie B: rys. 3.1. – 45% endofitów i 66% epifitów) – stąd pojawiające się pytanie czy była potwierdzana (choćby na podstawie obserwacji mikroskopowych) przynależność systematyczna szczepów? Ograniczona zawartość azotu w pożywce nie jest wystarczającym czynnikiem selekcyjnym gdyż wolnożyjące bakterie diazotroficzne zaliczamy nie tylko do rodzaju *Azotobacter*, ponadto na tych podłożach asymilatorom azotu mogą towarzyszyć także bakterie oligonitrofilne rozwijające się na pożywkach bardzo ubogich w azot;
- Wydaje mi się, że wykorzystanie wskaźnika Margalefa do oceny bioróżnorodności nie jest właściwe w odniesieniu do populacji mikroorganizmów zasiedlających fyllosferę w przypadku, kiedy nie istnieje (przynajmniej w chwili obecnej) praktycznie żadna możliwość oznaczenia wszystkich organizmów bytujących w tym środowisku (choćby drobnoustroje tzw. VNBC - *Viable But Nonculturable*). Nawet wyniki przedstawione przez samą autorkę (brak oznaczenia przynależności systematycznej licznych izolatów niezarodnikujących grzybów pleśniowych) dowodzą, że zastosowanie tego indeksu bioróżnorodności nie jest poprawne;
- Zwróciłam również uwagę na nieliczne pozycje literatury zacytowane w metodyce a także brak przeliczenia wyników uzyskanych z mikrobiologicznej analizy ilościowej na jeden gram suchej masy gleby.

Ocena merytoryczna pracy

Teoretyczne podstawy związane z celami badawczymi autorka przedstawiła w ciekawie i spójnie przygotowanym przeglądzie literatury. W ramach tego rozdziału dyplomantka dokonała szczegółowej analizy tekstów źródłowych bezpośrednio związanych z tematyką realizowanych badań podkreślając rolę fungicydów w ochronie roślin oraz narastającą oporność fitopatogenów na stosowane środki grzybobójcze, problemy związane z kumulowaniem się pozostałości pestycydów w środowisku a także uzdolnienia drobnoustrojów do inaktywacji szerokiej gamy zanieczyszczeń na drodze biodegradacji, biotransformacji, biomineralizacji czy bioakumulacji. Autorka zwróciła również uwagę na

fakt, że pomimo stosowania zasad dobrej praktyki rolniczej pozostałości środków ochrony roślin wykrywane są we wszystkich komponentach środowiska: glebie, wodach i w powietrzu co w konsekwencji może prowadzić do ich przedostawania się do produktów spożywczych i pasz.

Autorka pracy postawiła sobie ambitny cel dokonania oceny presji wybranych środków ochrony roślin na mikroorganizmy zasiedlające liście i ryzosferę pszenicy ozimej niebędące celem zwalczania oraz wyselekcjonowanie szczepów drożdży odpornych na fungicydy i zdolnych do biodegradacji azoksystrobiny i propikonazolu.

Zamierzony cel doktorantka osiągnęła przygotowując przemysłane doświadczenie wazonowe i dwa doświadczenia polowe, które w trzech kolejnych latach posłużyły licznym analizom laboratoryjnym. W ramach przeprowadzonych badań doktorantka dokonała mikrobiologicznej analizy ilościowej i jakościowej mikrobiomu pszenicy ozimej odmiany Bogatka, wyizolowała szczepy drożdży odporne na działanie fungicydów, oceniła ich uzdolnienia do biodegradacji azoksystrobiny i propikonazolu, a także dokonała ich identyfikacji metodami tradycyjnymi i metodą molekularną. Wyniki zestawiała w tabelach i przedstawiła graficznie na licznych wykresach

Uzyskane wyniki badań zostały poddane dyskusji w rozdziale piątym, w którym kolejno omówione zostały zmiany w składzie mikroorganizmów zasiedlających ryzosferę i fyllosferę pszenicy w warunkach polowych, odporność drożdży na działanie fungicydów w warunkach laboratoryjnych, ograniczenie fitotoksycznego działania preparatów Bumper 250EC i Amistar 250SC, rozkład testowanych preparatów przez bakterie oraz drożdże, a także scharakteryzowana została populacja drożdży fyllosferowych

W końcowym rozdziale autorka zamieściła wnioski z przeprowadzonych badań z których wynika, że testowane fungicydy w nieznacznym stopniu wpływały na ogólną liczebność mikroorganizmów jednak fungicydy azolowe i strobiluryny jednak w selektywny sposób działały na drobnoustroje powodując zmiany liczebności niektórych z nich jak bakterii z rodzajów *Pseudomonas* i *Azotobacter* oraz grzybów z rodzaju *Fusarium*; szczególnie duża presja selekcyjna miała miejsce w glebach punktowo zanieczyszczonych środkami ochrony roślin; izolaty drożdży pochodzących z roślin opryskiwanych fungicydami charakteryzowały się wysoką odpornością na duże stężenia propikonazolu i azoksystrobiny; odporność izolatów drożdży na strobiluryny (azoksystrobina) warunkowana była punktową mutacją G143A w genie cytochromu b (CYTb); zaprawianie nasion wyselekcjonowanymi szczepami drobnoustrojów (*Rhodotorula glutinis* i *Aureobasidium pullulans*) łagodziło fitotoksyczne działanie fungicydów w warunkach szklarniowych.

Mając na uwadze informacje zawarte w poszczególnych rozdziałach i podrozdziałach praca może stanowić istotną pozycję w literaturze związanej z zastosowaniem fungicydów w

ochronie roślin zbożowych oraz poszukiwaniem mikroorganizmów zdolnych do degradacji substancji toksycznych w środowisku.

Chciałabym jednak zwrócić uwagę, że treści zawarte w opracowaniu nie do końca korespondują z tytułem – gdyż sugeruje on, że w pracy większość informacji będzie dotyczyła danych na temat bioindykatorów a autorka bardziej skupiła się na charakterystyce mikroorganizmów zasiedlających fyllosferę i ryzosferę oraz selekcji drobnoustrojów odpornych na działanie pestycydów i zdolnych do ich rozkładu.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam również inne uwagi dotyczące pracy, mając jednocześnie nadzieję, że posłużą lepszemu przygotowaniu jej do druku:

- 1) Strona tytułowa - w języku angielskim imion i nazwisk nie należy odmieniać jak w języku polskim;
- 2) Nazwy łacińskie zawsze piszemy kursywą;
- 3) Należy ujednoczyć jednostki w całej pracy (układ SI) i wprowadzić poprawny zapis np. strona 30 - jest l/ha a powinno być - $\text{dm}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$, strona 34 - jest $\mu\text{l}/\text{dm}^3$ a powinno być - $\mu\text{l} \cdot \text{dm}^{-3}$ etc.;
- 4) Spis treści i tytuły rozdziałów:
 - rozdział 3.4.2. „Przeżywalność i biodegradacja fungicydów azolowych i strobilurynowych przez mikroorganizmy” - lepiej byłoby przedstawić w dwóch rozdziałach: „Ocena wpływu różnych stężeń fungicydów na przeżywalność drobnoustrojów” oraz „Biodegradacja fungicydów azolowych i strobilurynowych przez wybrane mikroorganizmy”;
 - rozdział 3.5.1. „Mikroskopowa identyfikacja i biochemiczna charakterystyka izolatów drożdży” - lepiej brzmiałoby – „Identyfikacja i charakterystyka właściwości biochemicznych izolatów drożdży”;
 - rozdział 3.5.5. „Detekcja spontaniczne mutacji ...” powinno być „Detekcja spontanicznych mutacji ...”;
 - rozdział 3.6.1. (strona 39 i 40) – dwa rozdziały mają ten sam numer;
 - rozdział 4.1. - proponuję „Ocena sposobu utylizacji środków ochrony roślin w gospodarstwach rolnych i ogrodniczych na podstawie badań ankietowych”;
 - rozdział 5.5. – proponuję „Charakterystyka populacji drożdży fyllosfery pszenicy ozimej”;
- 5) Strona 7 – jest: „strukturę epifitycznych...” i „strukturę mikroorganizmów...” - powinno być: „strukturę populacji epifitycznych...” i „strukturę populacji mikroorganizmów...”;
- 6) Strona 20 – jest: „są to grzyby heterotroficzne, nieruchome...” raczej nieruchliwe...;

- 7) Strona 24 – jest: „zdolne do zasiedlenie...” powinno być: „zdolne do zasiedlania...”;
- 8) Strona 29 – rozdział w metodyce „Warunki atmosferyczne” – sędzę, że w tym rozdziale należało podać w jaki sposób, w jakich terminach i przy wykorzystaniu jakiej aparatury dokonywano pomiarów a nie wyniki pomiarów. Jeżeli zamieszczono dane meteorologiczne pochodzące ze stacji pomiarowych należało podać źródło informacji (tabele 1 i 2). Dlaczego siłę wiatru podano w skali Beauforta?
- 9) Strona 30 - jest: „Wydziały Kształtowania...” – powinno być: „Wydziału Kształtowania...”;
- 10) Strona 33 – Williams-Davis – brak pozycji w spisie literatury;
- 11) Strona 37 - jest: „falkonów” - powinno być: „flakonów”;
- 12) Strona 39 – nie podano składu zawiesiny wprowadzanej do gleby skażonej ksenobiotykami;
- 13) Strona 40 - jest: „zanurzenie w zawiesinie jtk o gęstości $10^6 - 10^8$ w cm^3 ” - powinno być: „zanurzenie w zawiesinie drobnoustrojów o gęstości $10^6 - 10^8$ jtk w cm^3 ”
- 14) Strona 44 - jest: „pojawienie się epifityczne ...” - powinno być: „pojawienie się epifitycznych...”;
- 15) Strona 46 – jest: „zidentyfikowano mikroskopowo 3038 kolonii endofitycznych grzybów...” – powinno być: „zidentyfikowano mikroskopowo 3038 szczepów lub izolatów endofitycznych grzybów...”
- 16) Strona 51 – Zdanie: „ Z liści uzyskano łącznie 5260 kolonii epifitycznych grzybów strzępkowych i 820 kolonii endofitów, zidentyfikowanych do 20 rodzajów lub gatunków” nie brzmi zbyt fortunnie.
- 17) Strona 56 – „dyfundujących z antybiotykowych krążków...” – nie badano antybiotyków więc powinno być „dyfundujących z krążków”;
- 18) Strona 57 – Zdanie „Jedynie w przypadku izolatu A167Y wraz ze wzrostem stężenia propikonazolu do $50 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ na ogół wzrastała liczebność jego kolonii w 1cm^3 płynnego podłoża” - nie jest zrozumiałe!
- 19) Strona 62 – jeśli w doświadczenia A były prowadzone zabiegi biotechniczne polegające na opryskiwaniu roślin zawiesiną *Aureobasidium pullulans* to nie powinien dziwić fakt, że stanowią w tym doświadczeniu znaczący odsetek mikrobiota badanych roślin w odróżnieniu do doświadczenia B.
- 20) Strona 64 – jest: „W prezentowanych badaniach fungicydy stanowiły również silną selekcyjną presję na drożdże” – raczej wywierały presję a nie stanowiły;
- 21) Strona 71 – We wnioskach zabrakło mi podsumowania wyników badań ankietowych, ponadto uważam, że wniosek 3 jest zbyt uproszczony a 2 niepełny (zmiany bioróżnorodności były niekorzystne czy korzystne?);

- 22) Niektóre tabele zawierają niekompletne opisy lub są one nie do końca zrozumiałe,
23) Pozostałe drobne błędy zaznaczyłam w pracy.

Po szczegółowym przestudiowaniu pracy nasuwa mi się także następujące pytanie, na które oczekuję odpowiedzi od doktorantki: Jakie znaczenie dla roślin mają drobnoustroje zasiedlające endosferę?

Wniosek końcowy

Podsumowując recenzję stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa naukowa pt. „Wykorzystanie mikroorganizmów do oceny zanieczyszczeń fyllosfery i ryzosfery środkami ochrony roślin” przygotowana przez mgr inż. Katarzynę Kucharską stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wskazuje, że autorka posiada teoretyczną wiedzę z zakresu nauk rolniczych, zdolna jest do planowania eksperymentów, opanowała techniki laboratoryjne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy badawczej w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie ochrona i kształtowanie środowiska spełniając tym samym wymagania stawiane pracom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65 poz. 595 z późn. zm.).

W związku z powyższym wnioskuję do członków Rady Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie mgr inż. Katarzyny Kucharskiej do dalszych etapów postępowania przewodu doktorskiego.

Dr hab. inż. Maria J. Chmiel

