

UNIwersytet
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Prof. dr hab. Katarzyna Hrynkiewicz

26.09.2020 Toruń

Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych

Instytut Biologii, Katedra Mikrobiologii

Uniwersytet M. Kopernika w Toruniu

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Moniki Malickiej

p.t. „Bioróżnorodność grzybów mikoryzy arbuskularnej i ich wpływ na wzrost roślin w środowisku zanieczyszczonym toksycznymi związkami organicznymi”

1. Opis ogólny

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Moniki Malickiej została napisana pod kierunkiem Profesor dr hab. Zofii Piotrowskiej-Seget, będącej liderem Zespołu Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiskowej na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.

Głównym problemem badawczym rozprawy doktorskiej są złożone interakcje występujące pomiędzy roślinami i mikroorganizmami w warunkach stresu abiotycznego, związanego z obecnością węglowodorów w glebie. Praca łączy w sobie zarówno aspekty poznawcze jak i aplikacyjne, które mogą być wykorzystane w przyszłości w procesie fitoremediacji obszarów skażonych tymi związkami. Rozprawa powstała w oparciu o doświadczenia prowadzone zarówno w środowisku naturalnym, jak i w warunkach laboratoryjnych, z wykorzystaniem szerokiego wachlarza dostępnych technik badawczych. Struktura pracy jest zgodna z ogólnymi zasadami i wymaganiami stawianymi rozprawom doktorskim. Praca liczy łącznie 179 stron, w skład której wchodzi: wstęp wraz z przeglądem literatury (32 strony), cel pracy i hipotezy badawcze (2 strony), materiały i metody (31 stron), wyniki wraz z 15 Tabelami i 28 Rycinami (47 stron), dyskusja oraz podsumowanie i wnioski (22 strony), streszczenie (3 strony), literatura (~300 pozycji). Liczba, znaczenie i aktualność wykorzystanych referencji oraz sposób pisania potwierdzają praktyczną i teoretyczną wiedzę Doktorantki na temat przedstawianego w rozprawie problemu oraz dużą swobodę w opisywaniu tych niejednokrotnie złożonych i trudnych zagadnień. Praca została przygotowana niezwykle starannie pod względem edytorskim.

2. Znaczenie i aktualność zagadnień zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej

Mikoryza arbuskularna (AM, ang. *arbuscular mycorrhiza*) to najstarsza ewolucyjnie i najpowszechniejsza forma symbiozy pomiędzy roślinami i grzybami, która występuje u ok. 79% gatunków roślin naczyniowych, zasiedlających obszary wszystkich szerokości geograficznych. Grzyby arbuskularne (AMF, ang. *arbuscular mycorrhizal fungi*) odgrywają niezwykle ważną rolę w produktywności, stabilności i różnorodności naturalnych ekosystemów, a do czynników ją ograniczających należą, np. obecność metali ciężkich lub innych zanieczyszczeń oraz rodzaj występującej roślinności. AMF przyczyniają się do poprawy tolerancji roślin na niekorzystne warunki środowiska, chroniąc całe ekosystemy przed degradacją i niestabilnością. Warunki środowiskowe prowadzą do selekcji gatunków/szczepów grzybów mikoryzowych zdolnych do przetrwania w obecności ekstremalnie wysokich stężeń związków toksycznych, stąd też szczepy grzybów pochodzące z terenów zdegradowanych często wykorzystywane są w procesie fitoremediacji. Pozytywny wpływ inokulacji AMF roślin uprawianych na terenach skażonych metalami potwierdzono wielokrotnie, tymczasem jak dotąd niewiele wiadomo na temat udziału AMF w środowiskach zanieczyszczonych wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi (PAH, ang.

polynuclear aromatic hydrocarbons). Zanieczyszczenie środowiska węglowodorami PAH stwarza realne zagrożenie dla środowiska naturalnego i zdrowia ludzkiego ze względu na wysoką toksyczność względem wszystkich organizmów żywych. Związki te mogą wywierać również wpływ na różnorodność i możliwość tworzenia układów symbiotycznych z roślinami, selekcionując gatunki o najwyższej tolerancji, a co za tym idzie najwyższym potencjale aplikacyjnym. Fitoremediacja gleb terenów przemysłowych lub zanieczyszczonych PAH z wykorzystaniem wyselekcjonowanych AMF może stanowić obiecującą i stosunkowo tanią metodą w porównaniu z metodami fizykochemicznymi.

W przedłożonej rozprawie Doktorantka dokonała wnikliwego przeglądu dostępnej literatury naukowej dotyczącej grzybów arbuskularnych. Przedstawiła ogólną charakterystykę tych symbiontów, m.in. ich pozycję systematyczną, morfologię, strategię rozwojową i różnorodność funkcjonalną, znaczenie w odżywianiu roślin oraz znaczenie w ochronie roślin przed stresem abiotycznym i potencjał we wspomaganiu fitoremediacji gleb zanieczyszczonych węglowodorami. Ostatni rozdział jest najbardziej obszerny i stanowi moim zdaniem doskonały zarys przyszłej pracy przeglądowej.

3. Cele pracy

Głównym celem pracy, który został podjęty przez Doktorantkę było porównanie bioróżnorodności i rozwoju AMF (ang. *arbuscular mycorrhizal fungi*) w korzeniach i glebie ryzosferowej *Poa trivialis* L. (wiechlina zwyczajna) i *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. (trzcina pospolita) rosnących w środowisku zanieczyszczonym fenolem i wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi (PAH, ang. *total petroleum hydrocarbons*) i kontrolnym (niezanieczyszczonym), a także zbadanie potencjału AMF wyizolowanych z zanieczyszczonego terenu we wspomaganiu wzrostu *Lolium perenne* L. (życica trwała) w warunkach skażenia fenolem i PAH. Doktorantka postawiła 5 hipotez badawczych, które weryfikowała realizując kolejno zaplanowane zadania badawcze.

4. Wyniki pracy doktorskiej i ich znaczenie

Wyniki zaprezentowane w pracy doktorskiej stanowią spójną całość i prezentują jasny i logiczny przebieg zaplanowanych wcześniej doświadczeń. Wykonane analizy statystyczne i bioinformatyczne zostały przedstawione w formie starannie opracowanych Tabel i Rycin.

Doktorantka rozpoczyna opis wyników od zaprezentowania różnic w kolonizacji korzeni badanych roślin (*P. trivialis* i *P. australis*) i biomase AMF oraz bioróżnorodności AMF. Wyniki doświadczeń wykazały negatywny wpływ fenolu i PAH na powyższe parametry w przypadku obu badanych roślin, zwłaszcza zaś w przypadku *P. australis*. Na stanowiskach zanieczyszczonych dominowały AMF należące do rodzajów *Paraglomus*, *Funneliformis*, *Rhizophagus* i *Claroideoglomus*, zaś na niezanieczyszczonym (kontrola) do rodzajów *Archeospora*, *Paraglomus*, *Rhizophagus* i *Dominikia*. Badania bioróżnorodności AMF przeprowadzono w oparciu o dwie techniki: DGGE oraz NGS. Na duże uznanie zasługuje krytyczne i bardzo dojrzałe naukowo podejście Doktorantki do obu zastosowanych technik, które zostało zaprezentowane w Dyskusji (rozdział 5.1.3.2, str. 129-134). Technika DGGE jest metodą stosowaną w identyfikacji grzybów od wielu lat, jednak charakteryzuje się stosunkowo niską rozdzielczością gatunkową i specyficznością. Tymczasem, najnowsza jak dotąd technika NGS posiada również wiele słabych stron, o których musimy pamiętać podczas wykonywania analizy i interpretacji wyników, np. możliwość sekwencjonowania zbyt krótkich fragmentów, problemy z projektowaniem specyficznych starterów. Doktorantka przeprowadziła analizę NGS w oparciu o nowe, zaprojektowane na potrzeby niniejszego doświadczenia, startery oparte o region D2 genu LSU rDNA, które pozwoliły na całkowite pokrycie gromady *Glomeromycotina*.

W pracy wykazano również, że zanieczyszczenie gleby fenolem i PAH nie miało istotnego wpływu na ogólną biomasę mikroorganizmów glebowych, natomiast w glebie ryzosferowej *P. australis*, na stanowisku zanieczyszczonym, stwierdzono wyższą biomasę bakterii Gram-dodatnich, promieniowców i grzybów saprofitycznych. Doktorantka sugeruje, że promieniowce, oprócz fenolu i PAH, mogły być czynnikiem wpływającym hamująco na rozwój AMF. Jest to bardzo ciekawa obserwacja, która po wcześniejszym zweryfikowaniu bioróżnorodności wszystkich mikroorganizmów (bakterie, grzyby) metodą NGS, mogłaby znaleźć zastosowanie w przewidywaniu zależności i potencjału AMF w tworzeniu asocjacji mikroorganizmów na tego typu obszarach.

Doświadczenie donicowe, w którym przeprowadzono inokulację *L. perenne* pojedynczymi gatunkami AMF wykazało pozytywny wpływ symbiontów na wzrost roślin, niezależnie od stężenia fenolu i PAH w podłożu. Tymczasem, inokulacja trzema gatunkami AMF wykazała negatywny wpływ na wzrost i biomasę roślin. Tego typu obserwacja jest niezwykle ważna z punktu widzenia prowadzonych w przyszłości procesów fitoremediacji z zastosowaniem AMF. Nie zawsze więcej znaczy lepiej lub bardziej wydajnie, jak wykazano w doświadczeniu. Doktorantka świetnie wyjaśniła mechanizmy, które mogły mieć znaczenie

w tego typu złożonej interakcji (Dyskusja, str. 140-142). Opisane doświadczenie zostało wzbogacone o analizę poziomu aktywności enzymów antyoksydacyjnych w sporach AMF i w tkankach *L. perenne*. Wykazano, że inokulowane AMF rośliny nie różnią się pod tym względem z roślinami nie poddanymi inokulacji, rosnącymi w podłożu z fenolem i PAH.

W podsumowaniu tej części chciałabym zaznaczyć, że zaprezentowane w pracy doktorskiej wyniki zostały przedstawione w oparciu o odpowiednio dobrane analizy statystyczne, np. ANOVA, PCA i bioinformatyczne, co znacznie ułatwia interpretację złożonych wyników.

5. Wartości dodatkowe

Uzyskane wyniki stanowią ogromny potencjał, który poszerza wiedzę na temat bioróżnorodności i potencjału AMF w środowiskach zanieczyszczonych PAH. Poza tym, wyniki mogą znaleźć zastosowanie w fitoremediacji obszarów zanieczyszczonych PAH. Szeroki wachlarz przeprowadzonych badań, nowatorstwo podjętego problemu gwarantują autorce możliwość publikacji uzyskanych wyników w renomowanych czasopismach naukowych oraz wysoką cytowalność w niedalekiej przyszłości.

Doktorantka była kierownikiem grantu badawczego PRELUDIUM finansowanego z funduszy NCN (2017/25/N/NZ8/01676). Ponadto, odbyła liczne staże naukowe w renomowanych jednostkach zagranicznych, poszerzając swoje doświadczenie i umiejętności w pracy badawczej. Pani mgr M. Malicka jest pierwszą autorką pracy naukowej, która została opublikowana w 2020 roku w czasopiśmie *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 192, 110299. Ogólna aktywność naukowa Doktorantki jak i poziom przedłożonej do oceny pracy doktorskiej świadczy o jej dużych predyspozycjach do pracy naukowej.

6. Uwagi

W pracy nie udało się uniknąć kilku drobnych błędów lub niedociągnięć, które wymieniam poniżej:

(1) Wykaz skrótów (str. 9-10) – wyjaśnienie skrótu ERM. Powinno być: mycelium zewnątrzkomórkowe (jest: wewnątrzkomórkowe). Brak wyjaśnienia dla skrótu PAH.

(2) Przegląd literatury (str. 12) – słowo „arkusz mycelium” jest w mojej opinii nieco niefortunnym tłumaczeniem. Sugerowałabym określenie „warstwa mycelium”.

(3) Przegląd literatury (str. 20) – jest: „do biomasy mycelium wewnątrzkomórkowego (ERM - ...)”. Powinno być: „do biomasy mycelium zewnątrzkomórkowego (ERM - ...)”.

(4) Przegląd literatury (str. 25) – Czy chitooligosacharydy i lipopolisacharydy to czynniki Myc?

(5) Wyniki (str. 81) – brak wyjaśnienia do skrótu „is” pod Ryciną 23.

(6) Wnioski (str. 145) – We Wniosku 2 powinno być odniesienie w drugiej części zdania do gleby niezanieczyszczonej.

Poniżej kilka pytań:

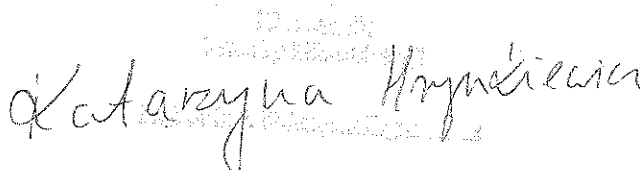
(1) Materiały i metody (72) – Czy sprawdzono przed rozpoczęciem doświadczenia donicowego różnice w sile kiełkowania spor zastosowanych do inokulacji *L. perenne*?

(2) Wyniki (str. 105) – Co oznacza sformułowanie „pozytywne kultury mikoryzowe”?

7. Wnioski

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Moniki Malickiej przedstawia szeroko zakrojone i doskonale zaprezentowane wyniki badań, co wpływa na jej ogólny bardzo wysoki poziom merytoryczny. Liczba moich uwag jest niewielka i nie wpływa na ogólną bardzo dobrą ocenę pracy. Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa spełnia warunki wymagane Ustawą z dnia 14.03.2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz.595), z późniejszymi zmianami z dnia 18.03.2011 roku (Dz. U. Nr 84, poz.455), w związku z art. 179 ust.1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. poz. 1669) i wnioskuję o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, zwracam się do Rady Dyscypliny o wyróżnienie pracy doktorskiej.



Prof. dr hab. Katarzyna Hryniewicz