



Dr hab. Magdalena Błaszak

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie 
Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiska
ul. J. Słowackiego 17, 71-434 Szczecin, tel. 91 449 6421, e-mail: Magdalena.Blaszak@zut.edu.pl

Szczecin, 21 września 2015

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Kucharskiej

pt. *Wykorzystanie mikroorganizmów do oceny zanieczyszczeń fyllosfery i ryzosfery środkami ochrony roślin*, wykonanej w Katedrze Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej, UWM w Olsztynie, pod kierunkiem dr hab. Urszuli Wachowskiej

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska zawiera 154 strony (w tym 89 stron tekstu zasadniczego i 65 stron tabel, rycin i fotografii), 302 pozycje cytowanej literatury, 39 tabel, 62 rycin, 13 fotografii. Podział strukturalny tekstu na rozdziały jest następujący: Wstęp i cel pracy, Przegląd literatury, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Literatura. Na końcu pracy zamieszczono tabele i ryciny oraz fotografie. Nie załączono wykazu tabel i rycin. **Strukturę rozprawy, kolejność rozdziałów, proporcję między poszczególnymi składowymi pracy oraz kompletność tez uważam za prawidłowe.**

Podjęty przez Panią mgr inż. Katarzynę Kucharską problem badawczy jest aktualny i zdecydowanie oryginalny. Wzrastająca świadomość społeczna dotycząca zanieczyszczenia środowiska związkami chemicznymi, w tym artykułów spożywczych i konsekwencji zdrowotnych tego faktu sprawiły, że pod naciskiem opinii społecznej, środowisk naukowych podjęto ogólnoeuropejską inicjatywę ograniczania chemizacji w rolnictwie. Obowiązek stosowania zasad integrowanej ochrony roślin przez wszystkich profesjonalnych użytkowników środków ochrony roślin począwszy od dnia 1 stycznia 2014 r. wynika z postanowień art. 14 dyrektywy 2009/128/WE oraz rozporządzenia nr 1107/2009. Artykuł 55 rozporządzenia nr 1107/2009/WE stanowi, że środki ochrony roślin muszą być stosowane właściwie, czyli nie profilaktycznie, a w ostateczności. Przeniesienie teorii na praktykę pozostawia jeszcze wiele do życzenia, jednak ogólny kierunek zmian w podejściu do priorytetów produkcji rolniczej został wyraźnie nakreślony. Trudno nie przyznać rolnikom i producentom żywności, że bez ochrony chemicznej płodów rolnych na kolejnych etapach produkcji (uprawa, magazynowanie, transport) powstałyby wysokie straty biomasy przeznaczonej do konsumpcji. Żywność trafiająca do konsumentów byłaby droższa i gorszej jakości użytkowej (problemy ze standaryzacją i estetyką owoców i warzyw trafiających do bezpośredniej konsumpcji). Jednak Autorka pracy ukazuje drugie oblicze postępującej chemizacji rolnictwa, przedstawiając skalę rozproszenia pestycydów w środowisku i konsekwencje związane z tym faktem. Mowa tu przede wszystkim o kumulowaniu substancji aktywnych w poszczególnych ogniwach łańcucha troficznego i w całym ekosystemie, jak również wykazywanej w wielu pracach naukowych toksyczności wyższych dawek pestycydów wobec organizmów żywych, w tym destruentów, będących niezbędnym ogniwem prawidłowo funkcjonującego obiegu pierwiastków w przyrodzie. Niestety, nawet sprawnie funkcjonujący mechanizm detoksykacji substancji trafiającej do organizmu nie jest w stanie zniwelować negatywnego jej wpływu, ponieważ jest stale obecna w organi-

zmie. Rozpowszechnienie pestycydów w płodach rolnych, zbożu (powszechny proceder desykcji zbóż glifosatem) sprawia, że są one obecne w produktach pierwszej potrzeby (np. w pieczywie), będących podstawą piramidy zdrowego odżywiania – w tym kontekście termin „zdrowe odżywianie” traci swój sens. Fungicydy to grupa środków ochrony roślin wykorzystywana do zabezpieczenia upraw, szczególnie sadowniczych, przed chorobami grzybowymi. Według danych zamieszczonych w Roczniku Statystycznym (GUS 2013), zużycie fungicydów i bakteriocydów w 2012 roku wynosiło przeciętnie $9,7 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ upraw w przeliczeniu na substancje aktywne fungicydów. Porównując poziom średniego zużycia wszystkich substancji aktywnych pestycydów ($5,3 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$) mamy obraz masowego rozprzestrzenienia środków grzybobójczych w środowisku. Według najnowszych danych, w 2014 roku jedynie o kilka procent zmniejszył się poziom zużycia fungicydów, więc problem rozproszenia tej grupy chemikaliów jest i prawdopodobnie będzie nadal aktualny. Autorka podjęła szeroko zakrojone badania (laboratoryjne, wazonowe i polowe) nad wpływem wybranych, popularnych fungicydów na bakterie i grzyby, wchodzące w skład mikrobiomu roślinnego (wybrano pszenicę ozimą odmiany Bogatka). Badano zarówno oddziaływanie fungicydów na strukturę mikrobiomu roślinnego, jak również podjęto próbę oceny przydatności wyselekcjonowanych bakterii i grzybów do biologicznej ochrony pszenicy. **Biorąc powyższe rozważania pod uwagę, wybór tematu rozprawy doktorskiej jest uzasadniony i trafny.**

Tytuł rozprawy doktorskiej budzi wątpliwości, nie jest do końca kompatybilny z postawionymi celami zaplanowanymi do realizacji. Tytuł sugeruje badania nad możliwością wykorzystania mikroorganizmów jako bioindykatorów zanieczyszczeń pestycydami, podczas gdy głównym celem pracy była charakterystyka mikrobiomu roślinnego poddanego presji pestycydów oraz wyselekcjonowanie i charakterystyka drożdży chroniących rośliny przed fitotoksycznością pestycydów.

Postawione przez autorkę pracy cele badań są merytorycznie uzasadnione i naukowo ciekawe, jednak sformułowane zbyt zawile. Długie, współrzędnie złożone zdanie traci swoją klarowność. Sugeruję podzielić ten ważny element pracy (podczas przygotowania publikacji naukowych) na krótsze jasne zdania. Autorka prawidłowo ustawiła kolejność priorytetów – celów przedstawionych do realizacji w pracy badawczej. Najpierw zaplanowała ocenić ogólny wpływ wybranych pestycydów na mikroorganizmy związane z poszczególnymi częściami pszenicy: ryzosferą, fylloferą, endosferą. Następnie zaplanowała wyselekcjonować i poddać analizie mikroorganizmy ograniczające fitotoksyczność fungicydów, odpornych i zdolnych do ich biodegradacji. Szczególną uwagę skupiła na drożdżach, które aktywnie wchodzi w interakcje z roślinami, a jednak nie są częstym obiektem badań mikrobiologów zajmujących się agrobiocenozą. W mojej opinii **postawione w rozdziale *Wstęp i cel pracy* cele i hipotezy badawcze są sformułowane poprawnie i kompletnie.**

W rozdziale zatytułowanym *Przegląd literatury* Autorka rozprawy syntetycznie opisuje zagadnienia związane z tematyką pracy. Sprawnie i prawidłowo operuje pojęciami i terminami naukowymi oraz posługuje się poprawną polszczyzną. Tekst pracy nie budzi zastrzeżeń stylistycznych i gramatycznych. Zakres wiedzy zawarty w rozdziale jest idealnie dobrany do tematyki badawczej, postawionych celów naukowych, nie jest zbyt ogólny i rozwlekły, ale rzeczowy i syntetyczny. **Autorka wykazała umiejętność tematycznego doboru piśmiennictwa, na podstawie którego stworzyła rozdziały *Przegląd literatury* i *Dyskusja*.** W dalszej części pracy Autorka potwierdza swoją wiedzę dotyczącą aktualnych zmian w prawodawstwie unijnym, jak i krajowym, odnośnie pestycydów oraz docenia istotność założeń integrowanej ochrony roślin, obowiązującej wszystkich profesjonalnych użytkowników środków ochrony roślin od 2014 roku. Autorka opisuje historię stosowania środków ochrony roślin ze szczególnym uwzględnieniem dwóch grup fungicydów – triazolowych i strobilurynowych – chroniących uprawy roślin ozdobnych, sadowniczych, zboża przed parchem, mączniakiem, rdzą i innymi chorobami grzybowymi. Pierwsza grupa fungicydów wykorzystywana jest na dużą skalę od kilkudziesięciu lat, natomiast strobiluryny stosowane są dopiero od lat kilkunastu. Strobiluryny to nowoczesne prepara-

ty, wywołujące stres oksydacyjny i zaburzenia w funkcjonowaniu łańcucha oddechowego komórek grzybowych (np. Discus 500 WG, Zato 50 WG, Ardent 500 SC). Fungicydy triazolowe, jak i strobilurynowe cieszą się dużą popularnością wśród użytkowników profesjonalnych, niemniej jednak odnotowano zjawisko uodporniania się patogenów grzybowych na substancje aktywne tych fungicydów, szczególnie w przypadkach nadużywania tych preparatów. Nie wszystkie mikroorganizmy są wrażliwe na opisywane fungicydy, niektóre wykazują tolerancję, a inne nabywają ją w drodze mutacji lub horyzontalnego transferu genów determinujących odporność. Autorka wnikliwie opisuje mikrobiologiczne mechanizmy nabywania odporności na fungicydy. Szerokie przedstawienie tradycyjnych, jak i nowoczesnych metod analityki mikrobiologicznej, w kontekście wykorzystywanych w pracy doktorskiej technik mikrobiologicznych, wzbogaca pracę i czyni ją kompletną. Jedyne niedociągnięcie, jakie można wskazać, to brak jednoznacznego połączenia faktów istotności i aktualności problemów, deficytu danych naukowych z koniecznością podjęcia właśnie takich badań. Czytelnik musi sam dochodzić do tego wniosku. **Podsumowując spostrzeżenia dotyczące rozdziału zatytułowanego *Przegląd literatury*, uważam, że zakres wiedzy teoretycznej dotyczącej problemu, wykazany przez Panią mgr inż. Katarzynę Kucharską jest zaawansowany i przedstawiony dojrzałe, w sposób wyważony.** Autorka ustrzegła się pisania nie na temat, według zasady – im więcej tym lepiej. **Podobnie formalna strona rozprawy nie budzi zastrzeżeń – pracę charakteryzuje poprawność językowa oraz dobra technika pisania.**

Zastosowane metody badawcze są na ogół właściwie dobrane i umożliwiają weryfikację postawionych przez autorkę tez. Na podkreślenie zasługuje też szeroki zakres prowadzonych badań, które można śmiało nazwać interdyscyplinarnymi. Pani mgr inż. Katarzyna Kucharska operuje wiedzą i warsztatem praktycznym z zakresu diagnostyki mikrobiologicznej, chemicznej i molekularnej. Jednak po szczegółowej analizie treści rozdziału nasuwają się pewne uwagi, spostrzeżenia i pytania, których, z racji roli recenzenta, nie mogę pominąć.

Zakres badań jest dość szeroki, obejmuje 3 lata doświadczeń polowych i liczne badania wazowne oraz laboratoryjne. Opis metodyki badań nie jest prostą lekturą, pomocne w ukazaniu logiki ułożenia doświadczeń i powodów, dla których są realizowane, byłoby zobrazowanie graficzne schematu badań, zwłaszcza że nie ma w pracy wyosobnionego podrozdziału nakreślającego schemat doświadczeń.

Autorka w doświadczeniu polowym A stosuje ochronę biologiczną pszenicy, wykorzystując do tego wybrane szczepy drożdży i bakterii (z rodzajów *Aureobasidium*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*), których właściwości nie opisuje, poprzestając na stwierdzeniu „dwa obiekty obejmowały ochronę mikroorganizmami antagonistycznymi w stosunku do patogenów”. Nie wiadomo o jakie antagonistyczne działanie chodzi oraz wobec jakich patogenów te szczepy testowano. Nasuwa się również pytanie – czy badano interakcje między tymi szczepami (co jest dość istotne, zważywszy że stosowano je w mieszaninie) oraz jaka była przeżywalność izolatów wprowadzanych do gleby. Istniejący opis szczepów jest niewystarczający, szkoda że Autorka nie opisała szerzej wstępnych badań prowadzących do wytypowania tych izolatów jako potencjalnie przydatnych we wspomaganiu upraw roślin, przecież forma rozprawy w postaci monografii nie limituje objętości tekstu. Kolejna uwaga, niejako w nawiązaniu do poprzedniej, dotyczy wątpliwości dotyczących ilości zaaplikowanych mikroorganizmów na poletka z pszenicą. Autorka podaje, że na powierzchnię poletka o wymiarze 20-25 m² trafiło 10⁷ komórek umieszczonych w 250 cm³ płynu (woda, płynne podłoże mikrobiologiczne, dodatek adiuwantu?). Brakuje precyzyjnego opisu techniki aplikacji oraz powstaje wątpliwość, czy taka niewielka dawka obcych szczepów ma realną szansę konkurować z rodzimą mikroflorą. Skąd decyzja o takich, a nie innych założeniach metodologicznych.

Kolejną wątpliwość budzi zastosowanie przez Autorkę rozprawy doktorskiej wskaźnika Margalefa (indeks bioróżnorodności) do oszacowania wpływu różnych sposobów ochrony pszenicy na strukturę populacji grzybów strzępkowych. Zazwyczaj wskaźnik ten jest wykorzystywany do oceny bioróżnorodności organizmów wyższych, poczynając od pierwotniaków, kończąc na ssakach. Jest to istotne spostrzeżenie, ponieważ badacz ma wtedy ogłód na 100% badanych osobników danego taksonu na danym obszarze badań. Czy badając grzyby strzępkowe, a nie mając pewności, że badania objęły 100% osobników danego siedliska, możemy oceniać bioróżnorodność wewnątrz taksonu? Zważywszy na utrudnienia związane z „niehodowalnością” mikroorganizmów na podłożach mikrobiologicznych (co prawda przede wszystkim dotyczy to bakterii, grzybów w mniejszym stopniu) trudno zakładać, że uzyskamy dane opisujące komplet grzybów danego siedliska. Wątpliwości przedstawię na przykładzie wyników badań zamieszczonych w Tabeli 4.1 i Tabeli 4.3, odnoszących się do tego samego doświadczenia polowego A. W pierwszej tabeli podano wyniki dotyczące liczebności poszczególnych grup mikroorganizmów izolowanych z ryzosfery pszenicy, w tym grzybów, nie podano co prawda terminu tych badań, ale przyjmijmy, że grzybów było w glebie przeciętnie od kilku do kilku setek tysięcy jtk w gramie gleby. Tymczasem struktura zbiorowisk ryzosferowych grzybów strzępkowych (przedstawiona w Tab. 4.3) dotycząca tych samych grzybów, których liczebność oszacowano wcześniej na co najmniej kilkaset jtk w 1 g gleby jest reprezentowana przez 3–4 gatunki, wyrosłe w postaci 4 kolonii na szalkach Petriego (jest to wynik w przeliczeniu na 1 g gleby, czy bezpośrednio z rozcieńczenia?). Kolonie niezarodnikujące, a więc nie podlegające identyfikacji mikroskopowej, stanowiły duży odsetek izolatów w tych badaniach (w zależności od doświadczenia ok. 20–60% ogółu wyizolowanych grzybów), które Autorka jednak traktuje jako jeden ten sam gatunek/rodzaj, brany pod uwagę do określenia bioróżnorodności (indeks Margalefa). Kwestię tę pozostawiam otwartą i poddaję pod dyskusję.

Rozdziały *Wyniki* i *Dyskusja* napisane są jasno i klarownie. Uważam, że dużym atutem dotyczącym pracy Pani mgr inż. Katarzyny Kucharskiej jest rzeczowość i logika w prowadzonym wywodzie. Świadczy to o dojrzałości autorki i zdolności do krytycznej weryfikacji informacji naukowej. Interpretacja wyników badań mikrobiologicznych doświadczeń polowych wieloczynnikowych jest trudna. Na organizmy żywe wpływa ogrom czynników środowiskowych, które modelują również wpływ badanych czynników. Czynniki doświadczalne to zaledwie kilka zdefiniowanych czynników – w dalszym ciągu pozostaje cały szereg przyczyn środowiskowych – oddziałujących pojedynczo i w interakcjach na badane parametry. Doświadczenie polowe, z jednej strony, imituje naturalne środowisko i przybliża realną odpowiedź na pytanie jak oddziałują czynniki w naturze, jednak, z drugiej strony, prawidłowa interpretacja wyników jest bardzo trudna i wymaga doświadczenia, wielu replikacji i pobrania licznych próbek. Autorka podjęła się wieloletnich rozległych badań, analizowała tysiące próbek pod względem różnych właściwości i poziomów czynników doświadczalnych i ten fakt należy mieć na uwadze. Większe zastrzeżenia mogą jedynie dotyczyć nie zawsze precyzyjnego opisu Tabel i Rycin. Dużym utrudnieniem jest umieszczenie wyników badań w formie graficznej na końcu pracy, a nie w treści rozdziału *Wyniki*. Utrudnia to znacznie weryfikację opisywanych zjawisk, tym bardziej że opisy zamieszczone w tytułach, tabelach i rycinach nie zawsze są kompletne. Przykładowo można zadać pytania: Którego roku badań dotyczą wyniki doświadczenia A zamieszczone w Tab. 4.1? Jaką objętość/masę materiału stosowano do oceny struktury zbiorowisk grzybów strzępkowych (np. Tab. 3.8, 3.9, 4.3)? Czy średnie wyniki liczebności bakterii z rodzaju *Azotobacter* lub *Pseudomonas* analizowane w zależności od terminu pobierania prób dotyczą tylko obiektu kontrolnego (np. Rys. 3.12, 3.13, 3.16)? Na jakie fungicydy są wrażliwe drożdże pozyskane w doświadczeniu polowym a testowane w teście dyfuzji, czy wyniki prezentują średnią wartość ze wszystkich zastosowanych fungicydów (np. Rys. 6.3, 6.4)? Niewątpliwie dane te można znaleźć w tekście rozdziału *Wyniki*, jednak Tabela i Rycina powinna

zawierać kompletne i autonomiczne dane zawarte w tytule i legendzie, by uniknąć uciążliwego wertowania stron pracy.

Wnioski są rzeczowe, uzasadnione wynikami badań, odnoszące się do postawionych w pracy celów badawczych. Nie jest łatwo w kilku punktach podsumować rezultaty wieloletnich badań. Zabrakło jednak próby uogólnienia i wskazania obszaru zastosowań uzyskanych wyników badań – wnioski mają raczej charakter skoncentrowanych wyników (wniosek nr 3 jest zbyt lakoniczny). Nie ma wniosku odnoszącego się do postawionego celu oceny poprawności utylizacji opakowań po pestycydach w gospodarstwach rolnych.

Powyższe uwagi nie umniejszają wysokiej wartości recenzowanej pracy, która wnosi wiele nowych danych i spostrzeżeń do oceny skuteczności biologicznej ochrony roślin, a szerzej do dziedziny integrowanego systemu ochrony roślin przed patogenami. Praca ma charakter naukowy, jednak również niesie przesłanki aplikacyjne, rozwojowe.

Wniosek końcowy:

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska autorstwa mgr inż. Katarzyny Kucharskiej pt. „Wykorzystanie mikroorganizmów do oceny zanieczyszczeń fylosfery i ryzosfery środkami ochrony roślin” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 roku o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym z późniejszymi zmianami. Biorąc pod uwagę treść pracy kwalifikuję panią mgr inż. Katarzynę Kucharską do ubiegania się o stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie ochrona i kształtowanie środowiska. Na tej podstawie stawiam wniosek o dopuszczenie autorki rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Szczecin 21.08.2015

.....
miejsowość, data

W. B. Tarsala

.....
podpis recenzenta