Lublin, 8.02.2024 r.

dr hab. Jolanta Jaroszuk-Ściseł, prof. UMCS
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej
Instytut Nauk Biologicznych
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Karoliny Kondratowicz
pt. „Fyllosfera makrofitów wybranych jezior poddanych antropopresji jako rezerwuar fitopatogenów ważnych w mykologii medycznej”,
wykonanej w Katedrze Mikrobiologii i Mykologii
Wydziale Biologii i Biotechnologii,
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Marii Dynowskiej
i promotora pomocniczego dr Ewy Sucharzewskiej

Tematyka recenzowanej rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Kondratowicz doskonale wpisuje się w najnowszy trend holistycznego rozumienia interakcji mikroorganizm-gospodarz zakładający, że mikroorganizmy zasiedlające różne systemy współewoluowały ze sobą (Berg i in. 2020). Podstawę holistycznego podejścia w koewolucji stanowi, opisywane koncepcją Jednego Zdrowia, zjawisko dynamicznego przepływu mikroorganizmów od jednego do drugiego gospodarza i do środowiska. Zakłada ona odwrót od koncepcji separacyjnej wyróżniającej mikroorganizmy patogeniczne, neutralne i symbionty oraz antagonistyczne i mutualistyczne interakcje pomiędzy gospodarzem a mikrobiotą. Zgodnie z podejściem holistycznym, w holobioncie stan chorobowy związany jest z dysbiozą, czyli małą różnorodnością związanej z gospodarzem mikrobioty określanej mianem „patobiomu”, zaś stanowi zdrowia odpowiada eubioza, czyli duża różnorodność zasiedlającej gospodarza mikrobioty.

Dąży się do zintegrowanego badania mikrobiomu, na który składa się protistom, eukariom, mykobiom, bakteriom oraz wirom. Obecnie głównie badania skupiają się na bakteriomie, a stosunkowo nieliczne dotyczą niezwykle ważnego pod względem funkcji jak i biomasy mykobiomu. Z kolei najczęściej badany jest mykobiom lądowych roślin uprawnych a badania pod tym względem mykobiomu roślin związanych ze środowiskiem wodnym są unikatowe. Dostrzeganie wśród przedstawicieli mykobiomu grzybów o różnym statusie troficznym, w tym fitopatogenów, a jednocześnie rozróżnianie tych, które są potencjalnymi czynnikami chorobotwórczymi, należy zaliczyć do wielkich atutów opracowanej rozprawy o zupełnie nowatorskim szerokim podejściu do mikroorganizmów wchodzących w interakcje z organizmem roślinnym. Poza tym nie do przecenienia jest aspekt środowiskowy podjętych badań nad mało poznanymi, a mającymi znaczący udział w ekosystemach, roślin przybrzeżnych—szuwarowych będących buforem zanieczyszczeń allogenicznych jezior. Jednocześnie poprzez wybranie jako źródła badanych roślin przybrzeżnych trzech jezior kąpieliskowych znajdujących się w bezpośrednim sąsiedztwie Olsztyna należy uznać, że badania zaprezentowane w rozprawie są ważne dla regionu, gdyż mogą przyczynić się do zapewnienia bezpieczeństwa epidemiologicznego i ochrony zdrowia publicznego mieszkańców Olsztyna i całego regionu Warmińsko-Mazurskiego.

To połączenie aspektów fitosanitarnych z sanitarnymi i epidemiologicznymi oraz połączenie klasycznych biologicznych metod z metodami molekularnymi sprawiło, że oceniana rozprawa doktorska zawiera bardzo wartościowe wyniki badań o charakterze aplikacyjnym i podstawowym.

Do najważniejszych i najcenniejszych elementów ocenianej pracy doktorskiej mgr Karoliny Kondratowicz należy skatalogowanie grzybów mikroskopijnych kolonizujących antropogeniczne siedliska przybrzeżnej roślinności jezior oraz wyodrębnienie spośród nich potencjalnie patogenicznych dla człowieka szczepów grzybów.

Ocena układu rozprawy doktorskiej i formalnej strony

Rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Kondratowicz przygotowana została jako monografia złożona z dwóch części, gdyż do pliku rozprawy załączony został, poza rozdziałem Załączniki znajdującym się w rozprawie, osobny plik zawierający Atlas grzybów.

Oceniana rozprawa doktorska liczy 204 strony, w tym 145 stron właściwej rozprawy i 59 stron z pięcioma różnorodnymi załącznikami: dwoma tabelami ze skatalogowanymi izolatami grzybów i roślin żywicielskich, metodyką i wynikami w postaci dendrogramów sekwencjonowania nanoporowego oraz dwóch rycin z dendrogrami Podobieństwa Spearmana dla poszczególnych gatunków grzybów oraz Analizą grupowania aglomeracyjnego (AHC) dla grzybów z rodzaju *Fusarium.* W rozprawie Autorka cytuje 270 pozycji literatury a przedstawione treści i bardzo bogatą, szczegółową dokumentację wyników prezentuje w postaci 19 tabel oraz 21 rycin, w tym 15 tabel i 14 rycin zawierających wyniki badań.

Atlas grzybów będący drugą częścią rozprawy liczy 57 stron i zawiera 127 fotografii grzybów mikroskopijnych dokumentujących zwykle ich stadium konidialne, głównie anamorficzne, a w niektórych tylko przypadkach, jak Fot. 43 *Giberella zeae,* czy Fot. 49, 50 i 51 *Leptosphaeria acorella, L. arundinacea, L. caricicola* stadium teleomorficzne i zarodniki workowe, na wybarwionych preparatach oglądanych w mikroskopie optycznym. Każda fotografia zawiera przynajmniej dwa obrazy mikroskopowe odpowiadające izolatowi, który należy do odrębnego gatunku grzyba, przy czym tylko w przypadku około 30 fotografii nie zostało określone przyporządkowanie do gatunku a tylko do rodzaju. Fotografie te prezentują przedstawicieli grzybów mikroskopijnych należących do niemal 60 rodzajów i często reprezentowanych przez jeden tylko izolat.

Uwagę zwraca bardzo dokładny opis badanych pod względem mykologicznym terenów i właściwych dla nich ekosystemów, co wskazuje na łączenie przez Doktorantkę zainteresowań wieloma dziedzinami biologii, w tym ekologią, hydrologią, botaniką a także mikrobiologią i genetyką. Wysoka jakość monografii wskazuje na dużą wiedzę Doktorantki i zainteresowanie tematem, a zarazem umiejętność korzystania z doświadczenia, umiejętności i wiedzy pracowników jednostki naukowej, w której realizowane były badania będące podstawą rozprawy doktorskiej.

Bardzo ciekawe jest odwołanie do badań fitopatogenicznych i hydromykologicznych z lat 60. XX wieku i wskazanie na ich kontynuację.

Widoczne jest, że doświadczenia zostały zaplanowane w oparciu o rzetelną wiedzę o wynikach wcześniejszych badań uzyskanych w macierzystej jednostce naukowej Doktorantki. Uzyskanie nowych wyników w tej dziedzinie wymagało nowych rozwiązań i dobrania nowoczesnych metod badawczych uzupełniających klasyczne metody, co zaowocowało spektakularnymi wynikami. Rozprawa jest starannie przygotowana, zawiera przejrzystą, w większości właściwie dobraną do prezentowania określonego typu wyników dokumentację graficzną, w tym dokumentację fotograficzną badań mikroskopowych zastosowanych do zobrazowania zidentyfikowanych izolatów grzybowych. Autorka potrafiła w bardzo przystępnej, syntetycznej formie przedstawić całość zagadnień, naświetlić cele i przebieg badań oraz podkreślić ważność uzyskanych wyników, wskazując na wkład w badania podstawowe jak i szerokie znaczenie ekologiczne i epidemiologiczne uzyskanych wyników.

Bardzo ważne dla reprezentatywności i statystycznej istotności wykonanych badań jest ich przeprowadzenie na bardzo dużej, bo liczącej 435 prób, grupie zawierającej fragmenty 11 gatunków roślin, które charakteryzowały się widocznymi zmianami chorobowymi. Autorce udało się zakwalifikować izolaty do 127 gatunków należących do gromady Ascomycota (120 gatunków) i Basidiomycota (7 gatunków) i stwierdzić ogromne zróżnicowanie różnorodności mykobiotycznej poszczególnych gatunków roślin. Największą (64 taksony) różnorodność stwierdzono u trzciny pospolitej (*Phragmites australis*) a najmniejszą (7 taksonów) na powierzchni liści grążela żółtego (*Nuphar lutea*). Zaobserwowano również zróżnicowanie funkcjonalne z wyłonieniem fakultatywnych i obligatoryjnych fitopatogenów i saprotrofów, a jednocześnie 40 gatunków potencjalnie chorobotwórczych dla człowieka.

Uzyskane wyniki zostały poddane analizie danych z obliczeniem wskaźników biocenotycznych oraz statystycznej analizy wariancji dla podkreślenia istotności ich różnic.

Układ rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Kondratowicz jest zgodny z normami przyjętymi dla tego typu opracowań, a na podkreślenie zasługuje bardzo duża skrupulatność, dokładność opisu i przejrzystość wynikająca z przyjętej koncepcji przygotowania rozprawy.

Rozprawa doktorska zawiera aż 10 rozdziałów poprzedzonych streszczeniem i abstractem w języku angielskim: (I) wstęp, (II) cel i hipotezy badawcze, (III) materiał i metody, (IV) wyniki, (V) dyskusja, (VI) wnioski, (VII) piśmiennictwo, (VIII) wykaz tabel, (IX) wykaz rycin.

Rozdział Hipoteza i cel Autorka poprzedziła podrozdziałem, w którym przedstawiła uzasadnienie wyboru tematu, przyjętych hipotez i celu. Kierowała się przy tym wynikami uzyskanymi we wcześniejszych badaniach własnych (Nowacka 2015), z których wyraźnie wynikało, że makrohydrofity mogą być zasiedlane przez liczne grzyby będące zarówno przyczyną chorób roślin jak i człowieka, przy czym najgroźniejszymi, budzącymi największe zainteresowanie mykologii lekarskiej są gatunki fitopatogenicznych grzybów należące do rodzaju *Fusarium* będące producentami różnych toksyn, takich, jak: deoxynivalenol (DON), niwalenol, zearalenon, moniliformina, fusariogenina toksyna T2, toksyna HT-2, neosolaniol, diacetoksyscirpenol. Fitopatogeniczne grzyby mikroskopijne zalicza się do czynników etiologicznych feohyfomykozy, keratomykozy, onychomykozy, hialohyfomykozy i grzybicy płuc a rzadziej otomykozy i chromoblastomykozy.

Sformułowano ważną hipotezę, że roślinność przybrzeżna jest ogniwem w łańcuchu epidemiologicznym chorób o etiologii grzybiczej a jednocześnie grzyby mikroskopijne zasiedlające fyllosferę makrofitów zbiorników wodnych są wskaźnikiem zdrowotności tych roślin oraz stanu sanitarnego środowiska, w którym te rośliny bytują.

Hipotezy weryfikowane były w dążeniu do oceny zróżnicowania taksonomicznego i ekologicznego mykobioty roślinności przybrzeżnej poprzez realizację pięciu wyraźnie sprecyzowanych zadań badawczych.

Bardzo trafnie wybrano 3 spośród 16 jezior biorąc za kryterium wyboru ich usytuowanie w różnych częściach miasta, wykorzystywanie do celów rekreacyjno-turystycznych oraz świadczącą o wysokim stopniu antropopresji zaawansowana eutrofia.

Wybrane jeziora różniły się stanem czystości: Kortowskie reprezentuje IV klasę czystości i słabą jakość, Skauda reprezentuje V klasę i odznacza się bardzo złą jakością wody, natomiast jezioro Długie charakteryzuje się bardzo dobrą jakością wody. Dodatkowo w przemyślany sposób wybrano stanowiska, równomiernie rozmieszczone na brzegu badanych zbiorników jednocześnie dzieląc te stanowiska na dwie grupy: (1) siedliska kąpieliskowe oraz (2) siedliska dzikie.

Zwraca uwagę bardzo szczegółowy opis terenu badań, czyli obszaru jeziora Kortowskiego, Skanda i Długiego, a także zawarta w odrębnym rozdziale charakterystyka 11 gatunków roślin szuwarowych, z których pobierano próby: (1) trzcina pospolita (*Phragmites australis*), (2) pałka wąskotlistna (*Typha angustifolia*) i (3) szerokolistna (*Typha latifolia*), (4) tatarak zwyczajny (*Acorus calamus*), (5) manna mielec (*Glyceria maxima*), (6) oczeret jeziorny (*Schoenoplectus lacustris*), (7) sit drobny (*Juncus bulbosus*), (8) grzybienie białe (*Nymphaea alba*), (9) grążel żółty (*Nuphar lutea*), (10) turzyce (*Carex* spp.). Głównym składnikiem roślinności szuwarowej stanowiącej naturalną strefę ekotoniczną jest przede wszystkim *Phragmites australis.*

Dążąc do osiągniecia postawionych celów Doktorantka wykorzystała szereg narzędzi badawczych oraz metod analizy uzyskanych danych bardzo dobrze dobranych do testowanego materiału badawczego.

Badania terenowe przeprowadzono w dwóch sezonach wegetacyjnych, w latach 2017 (I) i 2018 (II) w kilku terminach: w lipcu, sierpniu i wrześniu a nawet w październiku.

Dobrano ciekawą metodę izolacji poprzedzoną 2-5 dniową inkubacją w 25^{o}C powierzchniowo potraktowanych etanolem fragmentów liści na wilgotnej bibule a następnie pobierania odcisków z kolonii grzybów wyrosłych na fragmentach roślin za pomocą taśmy klejącej.

Preparaty przygotowano metodą Gerlacha 1972 z barwieniem błękitem anilinowym z laktofenolem. Do identyfikacji mikroskopowej wykorzystano mikroskop optyczny a dla wysuszonych preparatów mikroskop stereoskopowy. Wysuszone fragmenty posłużyły też do izolacji szczepów *Fusarium* na podłożu glukozowo-ziemniaczane (PDA) oraz agarze Sabourauda z 0,1% gentamycyną.

Bardzo ważne dla opracowania wyników było zastosowanie trzech właściwie wybranych wskaźników biocenotycznych:

1) frekwencji gatunku na podstawie liczby stanowisk badawczych, w których stwierdzono obecność danego gatunku grzyba na roślinie żywicielskiej, w stosunku do liczby wszystkich stanowisk badawczych stosując 5-cio stopniową skalę procentową;
2) wskaźnika dominacji gatunków grzybów mikroskopijnych wskazujący na liczebność gatunku i jego udziału w biocenozie;
3) współczynnika podobieństwa gatunkowego Jaccarda-Sörensena grzybów mikroskopijnych, zasiedlających poszczególne gatunki roślin żywicielskich (*Phragmites, Carex, Typha, Glyceria*) w litoralu trzech testowanych i porównywanych jezior.

Wykonano też odpowiednie analizy statystyczne danych: permutacyjną wielowymiarową analizę wariancji (PERMANOVA) oraz wyznaczono wskaźniki bioróżnorodności: wskaźnik dominacji Simpsona D, wskaźnik różnorodności Shannona *H′*, wskaźnik równomierności Pielou *J′*.

Doktorantka we współpracy z Katedrą Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej, Wydziału Rolnictwa i Leśnictwa, UWM w Olsztynie wykonała analizy z zakresu biologii molekularnej. Wyizolowano DNA z fragmentów kultur *Fusarium* stosując zestaw GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit firmy EURX. Otrzymane DNA posłużyło do sekwencjonowania nanoporowego. Przeprowadzono amplifikację i sekwencjonowanie regionu ITS1 i ITS4 ITS i Ef1α.
W celu identyfikacji grzybów produkujących deoksyniwalenol (DON) zastosowano metodę Vegi i Wolf-Hall (2013). Do reakcji PCR użyto starterów Tri5 (gen determinujący produkcję DON) oraz sondy FAM-TAMRA. Reakcję przeprowadzono używając mastermix Real-time PROBE 2x (A&A Biotechnology. Uzyskane czyste izolaty *Fusarium* spp., poddano analizom PCR z zastosowaniem starterów (GTG)5 oraz (GACA)4.

Określenia wytwarzania mykotoksyny i dynamiki wzrostu *Fusarium* dokonano za pomocą konkurencyjnego bezpośredniego testu ELISA (Veratox for DON 5/5, NEOGEN), który pozwolił określić stężenie mykotoksyn nawet na bardzo niskim poziomie (ppm). Metoda zakłada, że wolny DON w próbkach i kontrolach konkuruje ze znakowanym enzymem DON (koniugatem) o miejsca wiązania przeciwciał a po etapie przemywania substrat reaguje ze związanym koniugatem dając reakcję barwną (kolor niebieski), co oszacowano używając zestawu odczynników i mierząc OD w płytce 48-dołkowej za pomocą czytnika płytek wielodołkowych (Biokom, Polska) i przeliczono wykonując krzywą standardową na podstawie wzorców stężenia.

Wyniki badań opisane w rozprawie doktorskiej

Należy podkreślić, że wyniki wykonanych przez Doktorantkę badań, dotyczące ogromnej liczby izolatów reprezentujących różne gatunki, dla których uzyskano wiele danych są bardzo trudne do zaprezentowania i wyłonienia wyraźnych zestawień porównawczych, z czym jednak Doktorantka bardzo dobrze sobie poradziła.

Obecność grzybów mikroskopijnych wykazano w 98% (425 próbach) wszystkich testowanych prób. Na roślinach przybrzeżnych pobranych z poszczególnych zbiorników stwierdzono bardzo wysoki, niemal identyczny średni udział grzybów, od 96% (Jezioro Kortowskie), 97% (Jezioro Skanda) do 99% (Jezioro Długie), przy czym w wielu terminach uzyskiwano 100% wynik.

Zauważyć należy, że analiza wariancji wykazała statystycznie istotne różnice pomiędzy rokiem 2017 i 2018 a różnica pomiędzy jeziorami była istotna w zależności od rodzaju rośliny.

Ogółem otrzymano 1670 izolatów grzybów (przedstawionych w Załączniku 1), dla których stwierdzono przynależność do 127 gatunków. Spośród nich 40 gatunków to potencjalne czynniki etiologiczne, co Doktorantka stwierdziła na podstawie źródeł literaturowych z zakresu mykologii medycznej. Znaleziono tylko 7 gatunków należących do gromady Basidiomycota, pozostałe przypisano do Ascomycota. Sześciu zidentyfikowanych przedstawicieli Basidiomycota reprezentuje rząd Pucciniales: *Puccinia caricina, P. coronata, P. magnusiana, P. phragmitis, Puccinia* sp. oraz *Uromyces caricissempervirentis*. Tylko jeden gatunek należy do rzędu Sebacinales i jest nim *Chaetospermum chaetosporum*.

W rozprawie określono frekwencje poszczególnych gatunków grzybów na gatunkach rodzicielskich klasyfikując je w grupy gatunków: 1) sporadyczne<1%, 2) rzadkie 1-10%, 3) częste 11-30%, 4) pospolite 31-60% 5) masowe 61-100%. Przeważał udział gatunków występujących sporadycznie, reprezentowanych przez 70 taksonów, co stanowiło 55% udziału w różnorodności, wśród których były takie gatunki jak*: Ascochyta kirulisii, Cercospora juncifiliformis, Chaetomium globosum* czy *Curvularia.*

Doktorantka wykazała, że w ogólnej dominacji najliczniejszą grupą, byli subrecedenci – 113 gatunków (89% udziału), do których zakwalifikowano gatunki m.in. *Acremoniella atra*, *Alternaria tenuissima*, *Botrytis cinerea*, *Cheatospermum chaetosporum*, *Periconia byssoides*, *Phyllosticta coralliobola* czy *Stagonospora anglica*. Najmniej liczną grupą grzybów byli dominanci, do których należał tylko przedstawiciel rodzaju *Fusarium* (1% udziału). Do gatunków występujących masowo zaliczono *Alternaria alternata* (Fi=82,07%), do pospolitych gatunków *Cladosporium cladosporioides* (Fi=46,67%) oraz *Cladosporium herbarum* (Fi=45,29%) a często występującymi gatunkami były *Epiccocum nigrum*, *Fusarium* sp. i *Ramularia aromatica* (frekwencja 11-30% udziału).

Wskaźnik różnorodności Shannona, we wszystkich badanych jeziorach wykazał wartość, która przekraczała 3, co wskazywało na wysoką w nich różnorodność gatunkową grzybów. Na większą dominację jednego lub kilku gatunków w Jeziorach Skanda i Długie wskazywały najwyższe wartości wskaźnika Simpsona (0,093 i 0,084) a na równomierność występowania gatunków w jeziorze Kortowskim wartość najniższa-0,079. Największą różnorodność gatunkową grzybów stwierdzono na *Phragmites australis* – gatunku rośliny zasiedlanej przez 64 gatunki grzybów mikroskopijnych. Duże bogactwo gatunkowe mykobioty charakteryzowało *Glyceria maxima*, z której wyizolowano 41 gatunków grzybów oraz *Carex* sp., zasiedlonych przez 40 gatunków. Niewiele mniej grzybów odnotowano na *Typha angustifolia* – 38 i *Acorus calamus* – 30 gatunków. Do roślin, z których wyizolowano mniej niż 30 gatunków grzybów, należały: *Schoenoplectus lacustris* – 27 gatunków, *Carex acutiformis* – 26, *Typha latifolia* – 18 oraz *Juncus bulbosus* – 16. Najmniejszą różnorodność gatunkową grzybów odnotowano na *Nuphar lutea* – 7 oraz na *Nymphaea alba* – tylko 2 gatunki.

Stwierdzono istotne statystycznie różnice, przy wskaźniku Shannona, pomiędzy niemal 30 parami roślin, a brak statystycznej istotności dla 7 par. Natomiast za pomocą wskaźnika Simpsona, uzyskano brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy parami roślin: *Acorus*-*Phragmites* oraz *Acorus*-*Typha* a pomiędzy resztą par roślin uzyskano statystycznie istotne różnice.

Wartość współczynnika Jaccarda-Sörensena, wskazująca na udział wspólnych gatunków grzybów na wybranych roślinach żywicielskich w poszczególnych parach jezior kształtowała się w zakresie (największa 67,4% dla jezior Kortowskie i Skanda na *Phragmites australis* a najmniejsza pomiędzy jeziorami Kortowskie i Długie (17,65%) na *Glyceria maxima*.

Bardzo ciekawym wynikiem jest określenie, na podstawie analizy korelacji Spearmana, współwystępowania takich gatunków jak: *Acremonium alternatum* z *Asteromella acorella*, *Alternaria alternata* z *Cladosporium cladosporioides* a doskonałą korelacją (wartość 1,000) wykazano pomiędzy występowaniem *Alternaria longissima* z *Fusarium avenaceum.*

Doktorantka stwierdziła, że istnieje różnica w składzie gatunkowym po identyfikacji molekularnej od określonego metodami klasycznymi.

Wyniki amplifikacji i sekwencjonowania regionu ITS oraz EF1α pozwoliły wydzielić siedem grup grzybów *Fusarium* spp. o różnej liczbie izolatów. Na dendrogramie wyróżniono dwa główne klastry, które grupują izolaty *Fusarium* spp. występujące w badanych jeziorach uwzględniając poziomy mykotoksyny DON (deoksyniwalenolu). Nie stwierdzono wykrywalnego poziomu DON głównie u 17 izolatów *F. armeniacum* i to w większości pochodzących z fyllosfery *Phragmites*, dwóch izolatów *F. graminearum* a także u 1 izolatu *F. sporotrichioides*.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań potwierdziły sugestie, wynikające z obserwacji wstępnych, że fyllosfera roślinności przybrzeżnej jest niszą ekologiczną licznych mikrogrzybów.

Analizy statystyczne dotyczące różnorodności uzyskanych grzybów, wskazały na istotne statystycznie różnice pomiędzy dwoma badanymi latami. Mogło to być wynikiem zmian zachodzących w środowisku fyllosfery uwarunkowanych sezonowością, anomaliami pogodowymi lub naturalnymi fluktuacjami związanymi z porami roku. Na wszystkich roślinach żywicielskich i w ich fitocenozach, w każdym z trzech badanych zbiorników wodnych, dominowały gatunki występujące rzadko i sporadycznie, które miały największy udział w kształtowaniu różnorodności mykologicznej. Podobne wyniki obserwowane były w badaniach prowadzonych na innych terenach lub też w innych zbiorowiskach roślin.

Bardzo ważnym osiągnięciem recenzowanej rozprawy było wykazanie większej różnorodności gatunkowej na stanowiskach „dzikich” w stosunku do stanowisk kąpieliskowych. Na stanowiskach „dzikich” odnotowano najwięcej potencjalnych antropopatogenów. Mogło to być spowodowane tym,

że stanowiska „dzikie” charakteryzowały się większą różnorodnością gatunkową żywicieli niż stanowiska kąpieliskowe.

Wśród wyizolowanych grzybów odnotowano 40 gatunków potencjalnych antropopatogenów oraz 22 gatunki o przypuszczalnych właściwościach chorobotwórczych. We wszystkich jeziorach najwięcej prób z DON uzyskano ze stanowisk „dzikich”, co wskazuje, że w miejscach tych mogło być największe stężenie mykotoksyn fuzaryjnych.

Bardzo ciekawe zestawienie zawarto w tabeli 16, w której wyodrębniono 9 gatunków grzybów mikroskopijnych określonych jako nowe dla Polski, należących do 7 rodzajów *Ascochyta, Asteromella, Chaetospermum, Neottiospora, Pseudoseptoria, Scopinella* i *Selenophoma.*

Doktorantka w sposób klarowny przedstawiła uzyskane wyniki a w dyskusji zawartej w rozprawie porównała wyniki własne z wynikami innych badaczy.

Autorka podsumowała badania podkreślając największe osiągnięcia recenzowanej rozprawy formułując osiem wniosków. Pewien niedosyt budzi brak jednego-dwóch ogólnych wniosków, w których Doktorantka wyraźnie określiła związek składu mykobioty roślinności nadbrzeżnej a jakością wody oraz typem wykorzystania zbiornika (stanowiska kąpieliskowe i „dzikie”), co zostało oszacowane i podane w omówieniu wyników.

Reasumując recenzowana rozprawa doktorska jest kompleksowym opracowaniem, którego niewątpliwymi osiągnięciem jest uzyskanie pełnego przeglądu mykobioty fyllosfery o bardzo ważnych cechach funkcjonalnych oraz określenie stężenia mykotoksyn. Na szczególne podkreślenie w rozprawie doktorskiej mgr Karoliny Kondratowicz zasługuje nowatorski pomysł, adekwatne do założonego celu i zróżnicowane metody, wysoka jakość opracowania i prezentacji wyników.

Wyniki opisane w recenzowanej rozprawie doktorskiej mają znaczący wkład w poznanie środowiska wodnego i antropogenicznego.

Przedstawione i poddane analizie dane są niezwykle istotne z punktu widzenia poznawczego i aplikacyjnego, gdyż otwierają perspektywy praktycznego zastosowania wiedzy o mykobiomie roślin przybrzeżnych oraz opracowania procedur postępowania i środków zaradczych a także rozwoju badań nad oddziaływaniem toksycznych metabolitów wytwarzanych przez mykobiom tych roślin.

Zatem rozprawa doktorska mgr Karoliny Kondratowicz daje oryginalne rozwiązanie bardzo istotnego problemu badawczego. Opisane w rozprawie doktorskiej wyniki zgodnie z postawioną hipotezą potwierdziły, że fyllosfera roślinności przybrzeżnej jezior antropogenicznych odznacza się ogromną różnorodnością mykobiomu i jednocześnie jest siedliskiem grzybów mikroskopijnych potencjalnie chorobotwórczych dla człowieka oraz ogniwem w łańcuchu epidemiologicznym chorób o etiologii grzybiczej.

Na wyróżnienie zasługują bardzo dobrze dobrane modele doświadczalne zbiorników wodnych, stanowisk i roślinności szuwarowej oraz techniki doświadczalne, które odpowiednio dostosowano do badanego materiału roślinnego i uzyskanych izolatów. Wysoka jakość szczegółowej, drobiazgowej, staranie przygotowanej dokumentacji zaprezentowanej w rozprawie doktorskiej wskazuje, że Doktorantka bardzo dobrze posługuje się technikami badań botanicznych, ekologicznych, mikrobiologicznych, biochemicznych a także molekularnych oraz sprawnie wykorzystuje analizy ekologiczne i statystyczne. Wykonując doświadczenia w pełni wywiązała się z zadań, jakie zostały postawione w hipotezie i celach pracy.

Recenzowana praca napisana została w sposób wskazujący na dużą wiedzę teoretyczną i praktyczną, dążenie do rozwiązywania problemów o charakterze podstawowym i aplikacyjnym oraz umiejętność interpretacji wyników, ich syntetycznego przedstawienia oraz wnikliwej dyskusji.

Rozprawa doktorska mgr Karoliny Kondratowicz jest opracowaniem spełniającym wszystkie warunki wymagane odpowiednią ustawą dla rozpraw doktorskich.

Przy lekturze rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Kondratowicz nasuwają się drobne uwagi:

1. Wprawdzie obecnie równolegle funkcjonują różne systemy klasyfikacyjne, ale przedstawiony na stronie 16 w rozdziale Wstęp podział systematyczny grzybów na gromady jest zdecydowanie nieaktualny. Nawiązuje on częściowo do podziału Marguliusa i Schwartza z 1982 roku (ze zmianami z 1998 r.), w którym wyodrębniono gromadę Deutoromycota, do wszystkich gromad włączano rodzaje

o nieustalonej przynależności (*incertae sedis*), a do gromady Deuteromycota nawet takie jak *Fusarium, Alternaria, Aspergillus*, czy *Verticilium*.
2. Czy 9 gatunków grzybów mikroskopijnych (należących do 7 rodzajów *Ascochyta, Asteromella, Chaetospermum, Neottiospora, Pseudoseptoria, Scopinella* i *Selenophoma*) zestawionych w tabeli 16 określonych jako nowe dla Polski nie występowały w Polsce na roślinach przybrzeżnych czy na żadnych roślinach?
3. W Atlasie grzybów zawierającym piękne zdjęcia preparatów grzybów mikroskopijnych powinno znaleźć się krótkie wprowadzenie informujące o liczbie rodzajów i gatunków oraz metodzie ich wybarwienia i obserwacji. Szkoda, że skala większości zdjęć jest niestety niewidoczna a bardzo cenne byłoby także określenie rozmiarów mikro- i makrokonidii czy zarodników workowych na prezentowanych w Atlasie zdjęciach.
4. Autorka nie pisze w rozprawie o mykobiocie epifitycznej i endofitycznej nie rozróżniając tych dwóch grup mikroorganizmów zasiedlających fyllosferę a metoda izolacji i przygotowania preparatów też nie umożliwia wyraźnego odróżnienia tych grup. Natomiast w załączniku nr 3 napisane zostało o sekwencjonowaniu nanoporowym w celu ogólnej charakterystyki mikroorganizmów epifitycznych.
Proszę o ustosunkowanie się do tego stwierdzenia. Czy według Doktorantki badane były mikroorganizmy epifityczne czy razem mikroorganizmy powierzchniowe i wewnętrzne fyllosfery?
5. Badania zdolności do wytwarzania deoxynivalenolu (DON) przez izolaty *Fusarium* są bardzo ważną częścią rozprawy doktorskiej. Nie jest jednak jasne, co było próbą badaną w testach immunologicznych określających stężenie DON. Czy była to biomasa izolatów *Fusarium* czy płyn hodowlany? Sformułowanie „stężenie wartości DON" jest błędne. Powinny być określone wartości stężenia DON wyrażone w odpowiednich jednostkach wagowych wyraźnie podanych w metodyce oraz przy prezentacji danych na wykresie w przeliczeniu na suchą masę grzybni izolatów *Fusarium*, suchą masę liści roślin lub objętość hodowli/zawiesiny. Tytuł ryciny 20 brzmi „Wykres stężenia DON (deoksyniwalenol) w wybranych izolatach *Fusarium",* ale brak opisu osi X (najprawdopodobniej pokazano na niej numery izolatów *Fusarium* spp.), a przede wszystkim osi Y, która musi zawierać opis w jakich jednostkach wyrażone zostało stężenie DON. Dopiero pod ryciną Autorka opisuje, że na wykresie zostały zaprezentowane wyniki pomiaru OD, czyli spektrofotometrycznego (przy jakiej długości fali?) i nie zostały one przeliczone na masę DON ani na masę próby. Czy Doktorantka może przedstawić takie przeliczenia wartości OD (uzyskane zastosowaną metodą ELISA z użyciem komercyjnego zestawu odczynników i czytnika płytek) na podstawie krzywej wzorcowej (o której pisała Autorka w rozdziale opisującym metodykę) sporządzonej dla wzorców DON o określonym stężeniu a następnie odnieść stężenie DON do masy lub objętości próby?
Podobnie rycina 21 zatytułowana „Wykres dynamiki wzrostu (OD) *Fusarium"* nie posiada tytułów osi. Proszę wyjaśnić w jakiej próbie (hodowla płynna, zawiesina) i przy jakiej długości fali dokonano pomiaru?
Wykres liniowy powinien być zastąpiony słupkowym, gdyż liniowy służy do śledzenia zmian np. w czasie a ryciny 20 i 21 pokazują kolejne izolaty.
6. Metoda przygotowania odczynnika do barwienia preparatów grzybów w ważnej części diagnostyki izolatów w obserwacji mikroskopowej w mikroskopie optycznym powinna być podana dokładnie z uwzględnieniem składu procentowego i procedury łączenia składników.
Niniejsze uwagi, mają charakter marginalny i nie umniejszają zupełnie wartości rozprawy.

Chciałabym prosić Doktorantkę o odpowiedzi na pytania nawiązujące do przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników:

1. Czy na podstawie uzyskanych danych dla trzech zbadanych jezior o wodzie różnej jakości można wykazać korelację pomiędzy liczebnością lub różnorodnością gatunkową grzybów mikroskopijnych a jakością wód danego zbiornika?
2. Czy dostrzega Doktorantka możliwości przeciwdziałania zasiedlaniu fyllosfery roślin przybrzeżnych przez grzyby patogeniczne dla człowieka?
3. Jakie widzi Doktorantka możliwości ograniczania zagrożenia epidemiologicznego ze strony mykobioty patogenicznej dla człowieka zasiedlającej rośliny przybrzeżne, czyli przenoszenia tych grzybów do organizmu człowieka oraz ich negatywnego wpływu na stan zdrowia ludzi? Czy jest szansa na stworzenie/udoskonalenie takich metod w przyszłości?

Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Karoliny Kondratowicz zatytułowana „Fyllosfera makrofitów wybranych jezior poddanych antropopresji jako rezerwuar fitopatogenów ważnych w mykologii medycznej”, stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego oraz **spełnia warunki określone w Ustawie** z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.) oraz w art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.)

W związku z powyższym, przedstawiam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

wniosek o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Kondratowicz do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom recenzowanej rozprawy doktorskiej, wartość naukową oraz znaczenie epidemiologiczne i środowiskowe przeprowadzonych badań **wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Kondratowicz stosowną nagrodą**.

Signed by / Podpisano przez:
Jolanta Ewa Jaroszuk-Ściseł
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
Date / Data: 2024-02-08 20:10

dr hab. Jolanta Jaroszuk-Ściseł, prof. UMCS