

Streszczenie pracy doktorskiej pt. „Mykobiota związane z nymfeidami wybranych stanowisk Pobrzeża Szczecińskiego”, wykonanej w Katedrze Hydrobiologii, Ichtiologii i Biotechnologii Rozrodu

Autor pracy: **mgr inż. Aleksandra Rybińska**

Promotor pracy: **prof. dr hab. Kinga Mazurkiewicz-Zapalowicz**

Nymfeidy odgrywają istotną rolę w funkcjonowaniu ekosystemów wodnych, wpływając na biotyczne i abiotyczne warunki w nich panujące. Rośliny te stanowią nieodłączny element jezior typu linowo-szczupakowego. W akwenach tych fitocenozy nymfeidów tworzą schronienie różnych gatunków ryb: karasia (*Carassius carassius*), lina (*Tinca tinca*), płoci (*Rutilus rutilus*) oraz wzdregi (*Scardinius erythrophthalmus*). Ponadto, są zapleczem pokarmowym dla ryb drapieżnych, m.in. szczupaka (*Esox lucius*).

Niektóre gatunki nymfeidów objęte są w Polsce ochroną gatunkową. Na mocy Rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 9 października 2014 r. grązel drobny (*Nuphar pumila*) i grzybieńczyk wodny (*Nymphoides peltata*) podlegają ochronie ścisłej, a grzybienie białe (*Nymphaea alba* (NA)) i grzybienie północne (*Nymphaea candida* (NC)) – ochronie częściowej. Dodatkowo, w ramach programu NATURA 2000, siedliska tych roślin, wyznaczone zgodnie z wytycznymi Dyrektywy Habitatowej, są chronione jako obszary stanowiące wyjątkowo cenne zasoby przyrodnicze Europy.

Wyżej wymienione aspekty stanowiły podstawę do poznania kondycji zdrowotnej roślin tworzących te unikalne fitocenozy. Celem podjętych badań było określenie bogactwa gatunkowego mykobiota zagrażających zdrowotności nymfeidów w wybranych zbiornikach Pobrzeża Szczecińskiego, określenie aktywności *Colletotrichum nymphaeae* oraz możliwości ograniczenia jego rozwoju przez grzyby drożdżoidalne oraz wskazanie na potencjalne zagrożenie ichtiofauny, wynikające z obecności mykobiota na nymfeidach.

Badania zdrowotności nymfeidów tworzących związek *Nymphaeion* żabiściek pływający (HMR; *Hydrocharis morsus-ranae*), grzybienie białe (NL; *Nymphaea alba*), grzybienie północne (NC; *N. candida*) oraz grązel żółty (NL; *Nuphar lutea*) na terenie Pobrzeża Szczecińskiego prowadzono w trzech kolejnych sezonach wegetacyjnych 2015 – 2017. Nymfeidy zbierano z 15. stanowisk zbiorników wodnych; na Jeziorze Dąbie umiejscowiono dwa stanowiska (Bystra – 14 i Lubczyzna – 13), natomiast nad Zalewem Szczecińskim cztery stanowiska (Kopice – 10; Nowe Warpno – 8; Stepnica - 11 oraz Trzebież - 9). Na pozostałych zbiornikach wyznaczono pojedyncze stanowiska badawcze: Jezioro Myślibórz Wielki (7), J. Piaski (6), J. Piaszynko (5), J. Stolsko (4), J. Szmaragdowe (15), J. Świdwie (3), Strumyk Bogdanka (1), Rzeka Gunica (2) i staw w Świętej

(12). Stwierdzono, że bogactwo gatunkowe mykobiota w fitocenozach związku *Nymphaeion* charakteryzują łącznie 72 taksony, wśród których dominują stadia anamorficzne Ascomycota (53 taksony), stanowiące 74 % (Moniliales – 44 taksony, Sphaeropsidales – 7 taksonów i Melanconiales – 1 gatunek *Colletotrichum nymphaeae*). Stwierdzona obecność organizmów grzybpodobnych (OGP): *Apodachlya* sp., *Pythium* sp. i *Elongisporangium undulatum* (= *Pythium undulatum*), który występował masowo w każdym roku badań, stwarza dla zdrowotności nymfeidów nowe zagrożenia, ponieważ patogeny te są szczególnie przystosowane do życia w wodzie. Wśród zidentyfikowanych gatunków mykobiota na uwagę zasługują także *Botrytis cinerea* i *Ascochyta kirulisii*, które są nowymi fitopatogenami, odpowiednio dla NC i HMR. Po raz pierwszy na terenie Pobrzeża Szczecińskiego, i prawdopodobnie w Polsce, na HMR stwierdzono obecność *Tracya hydrocharidis* i *Ascochyta kirulisii*. Na gatunkach badanych nymfeidów wykazano obecność termofilnych micromycetes *Athelia rolfsii*, *Fusarium incarnatum*, *Gilmaniella humicola* i *Rhizopus stolonifer*. Cztery gatunki grzybów: *Fusarium avenaceum*, *F. incarnatum*, *F. sporotrichioides* oraz *Colletotrichum nymphaeae* wystąpiły na wszystkich badanych roślinach Nymphaeaceae. Blisko 80% gatunków mikroorganizmów występujących na roślinach *Nymphaea alba* i *Nuphar lutea* to gatunki wspólne (wskaźnik Soerensena).

Udowodniono, że stan zdrowotny roślin Nymphaeaceae determinuje przede wszystkim masowa obecność *Colletotrichum nymphaeae*. w warunkach laboratoryjnych potwierdzono, przy użyciu testu API-ZYM, aktywność enzymów hydrolitycznych z grupy fosfataz (fosfataza alkaliczna, kwaśna fosfataza, fosfohydrolaza naftylo-AS-B), lipaz (esteraza (C4), esteraza lipaza (C8)), oksydoreduktaz (α -galaktozydaza, β -galaktozydaza, β -glukuronidaza, α -glukozydaza, β -glukoydaza, N-acetylo- β -glukozaminidaza, α -mannozydaza, α -fukozydaza) oraz proteaz (arylamidaza leucyny, arylamidaza waliny, arylamidaza cystyny, α -chymotrypsyna) wytwarzanych przez ten gatunek, z których większość ma znaczenie w przebiegu patogenez. Dowiedzono także, że zmiany chorobowe wywołane przez *C. nymphaeae* na NA można ograniczyć wykorzystując w biokontroli antagonistyczny wpływ powszechnie występujących w wodzie szczepów grzybów drożdżoidalnych *Pichia fermentans* i *Pichia kudriavzevii*.

01.07.2019 Aleksandra Rybińska

Dr hab. inż. Wojciech Pusz, prof. UPWr.
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Zakład Fitopatologii i Mykologii
pl. Grunwaldzki 24a
50-363 Wrocław

Wrocław, dn. 27.08.2019 r.

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej **mgr inż. Aleksandry Rybińskiej**
pt. "Mykobiota związane z nymfeidami wybranych stanowisk Pobrzeża Szczecińskiego"
wykonanej na Wydziale Nauk o Żywności i Rybactwa,
Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie
Promotor rozprawy: prof. dr hab. Kinga Mazurkiewicz-Zapałowicz

Niniejszą recenzję sporządzono w odpowiedzi na pismo Dziekana Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa, Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, pani dr hab. Agnieszki Tórz, prof. ZUT, z dnia 26 czerwca 2019 roku, informującego o wyznaczeniu mojej osoby przez Radę Wydziału na opiniodawcę w przedmiotowej sprawie.

Problematyka badawcza podjęta w pracy

Nymfeidy są niezwykle cennym elementem przyrody Pobrzeża Szczecińskiego. Z racji występowania na obszarach ujętych w tzw dyrektywie habitatowej Unii Europejskiej stanowią one nieodłączny element ekosystemów wodnych, wpływając bezpośrednio i pośrednio na inne organizmy żywe. Z racji tego faktu wchodzi w skład siedliska Natura 2000 - „Starorzecza i naturalne zbiorniki wodne” (kod 3150). Większa bioróżnorodność nymfeidów, a także ściśle z nimi powiązanych organizmów fito- i zooperyfitonu, zwiększa różnorodność gatunkową, a także liczebność zarówno bezkręgowców jak i kręgowców. Dodatkowo nymfeidy stanowią ochronę przed czynnikami abio- jak i biotycznymi dla szeregu gatunków związanych ze środowiskiem wodnym oraz pełnią istotną rolę w biologii ryb. Trudno pominąć wpływ nymfeidów na kształtowanie warunków fizykochemicznych wód i ich zdolność do akumulacji metali ciężkich czy też pierwiastków biogennych co z kolei może prowadzić do samooczyszczania się zbiornika wodnego. Nymfeidy znajdują także swoje zastosowanie w przemyśle i medycynie.

Uwzględniając znaczenie nymfeidów w życiu biologicznym zbiornika wodnego oraz ich wpływ na całe środowisko wodne wydaje się niezmiernie słusznym wybór niniejszego tematu rozprawy doktorskiej przez panią mgr Aleksandrę Rybińską. Doktorantka postawiła sobie ambitne cele badawcze na które składało się (1) określenie składu gatunkowego mykobioty wpływającej na zdrowotność nymfeidów (2) wskazanie na potencjalne zagrożenia dla ichtiofauny, wynikające z obecności grzybów (oraz organizmów grzybopodobnych) na nymfeidach, a także (3) określenie aktywności grzyba *Colletotrichum nymphaeae* oraz możliwości jego ograniczenia przez grzyby drożdżoidalne.

Merytoryczna ocena pracy

Autorka w części rozprawy poświęconej przeglądowi stanu wiedzy w rzetelny sposób zapoznaje czytelnika ze znaczeniem nymfeidów dla ekosystemów wodnych, starając się udowodnić, że ograniczenie występowania tej grupy roślin może wpłynąć na życie biologiczne w danym zbiorniku wodnym. Wszystkie argumenty popiera starannie dobranym materiałem źródłowym. Autorka przechodzi następnie do przeglądu materiałów źródłowych, opisujących rolę grzybów mikroskopowych dla organizmów żyjących w środowisku wodnym, wskazując na niedostateczny poziom poznania tego problemu. Mając pełny obraz przedstawionego zagadnienia uważam, że kolejny podrozdział, w którym pani mgr opisuje znaczenie mykobioty w biologicznej ochronie roślin został potraktowany nieco powierzchownie i nie jestem przekonany czy został on umieszczony w odpowiednim miejscu rozprawy. Nie znalazłem w tym miejscu informacji jak wygląda rynek biologicznych środków ochrony roślin w naszym kraju. Proszę aby Doktorantka odpowiedziała na pytanie jak dużo jest na rynku krajowym takich preparatów? Jakie są według Niej „minusy” tego rodzaju środków ochrony roślin?

Po części poświęconej wykorzystaniu grzybów w biologicznej ochronie roślin pojawia się podrozdział, opisujący aktualny stan badań nad mykobiotą związaną z nymfeidami na świecie i w Polsce. Niektóre sformułowania są w moim mniemaniu zbyt potoczne jak chociażby wykorzystanie przez Autorkę słów na stronie 15: „(...) *zagrożenie dla zdrowia NA* (...)” czy też „(...) *pogorszyło istotnie zdrowia roślin* (...)”. Co Doktorantka miała na myśli pisząc, o „*istotnym pogorszeniu zdrowia rośliny*”? Niedociągnięciem tej części pracy jest wymienienie za każdym razem pełnej nazwy gatunkowej grzyba. Normą jest, że tylko za pierwszym razem podawana jest pełna nazwa tzn. rodzajowa i gatunkowa, a następnie tylko pierwsza litera nazwy rodzajowej. Proszę aby Autorka miała to na względzie gdy będzie przygotowywać manuskrypt celem jego opublikowania w fachowej literaturze. Interesuje mnie czy opisywane przez Doktorantkę gatunki nymfeidów, które są „uprawiane” w warunkach amatorskich w zbiornikach sztucznych także chorują? Ostatnie dwa akapity podrozdziału 3.7 są bardzo chaotycznie napisane, bez odniesienia do poprzednich akapitów co powoduje, że sprawiają wrażenie „doklejonych”. Moim zdaniem warto było tę część podsumować kilkoma zdaniami, wskazując na doniosłość niniejszej pracy doktorskiej i jej pionierski charakter.

Chaos wkrada się także do kolejnego rozdziału rozprawy, poświęconego opisaniu metodyki badawczej. Badania terenowe prowadzone były w latach 2015 – 2017 na 15 stanowiskach zlokalizowanych na terenie Pobrzeża Szczecińskiego. Doktorantka wymienia punkty

badawcze - niestety zastosowana numeracja wprowadza nieco zamieszania gdyż numery stanowisk badawczych rozpoczynają się od liczby 14. W kolejnej części opisuje objawy chorobowe jakie obserwowała wraz z terminami zbioru materiału roślinnego, wyjaśniając na stronie 21 sytuację związaną z uzyskaniem pozwoleń na pobór roślin wydaną przez Regionalną Dyрекcję Ochrony Środowiska w Szczecinie, by na stronach 22 – 23 opisać dokładnie badane stanowiska. Jest to niefortunne ułożenie tekstu, utrudniające sprawne poruszanie się czytelnika po tekście rozprawy. Jeszcze większy dyskomfort odczułem gdy na stronie 23 znalazł się opis Jeziora Świdwie podczas gdy w dalszej części rozprawy Autorka zamieszcza dokładny opis Rezerwatu (prawdopodobnie chodzi o Rezerwat Przyrody Świdwie bo Doktorantka nie używa pełnej nazwy tego obiektu skupiając się na słowie „Rezerwat”). W tabeli numer 6 wymienia stanowiska badawcze należące do sieci Natura 2000 wraz z ich kodami. W przyszłości, gdy Autorka będzie przygotowywać tekst do ewentualnego artykułu konieczne jest przeredagowanie tej części rozprawy, skrócenie jej i przedstawienie informacji o stanowiskach badawczych w jednej, a nie jak obecnie w czterech tabelach.

Kolejne moje pytanie związane jest z informacjami zawartymi w tabeli numer 2. Czy była oceniana w jakikolwiek sposób zdrowotność roślin? Jeśli tak to według jakiej skali? Daje się zauważyć, że w niektórych latach Autorka nie pobierała gatunków roślin do badań laboratoryjnych – czy jak miemam było to związane z brakiem występowania objawów chorobowych? Pragnę także zauważyć, że na stronie 19, w miejscu gdzie Doktorantka wymienia objawy chorobowe, używa w tym celu słowa „gnicie”. Proponuje w przyszłości używać sformułowania bardziej trafnego i zdecydowanie częściej wykorzystywanego w słownictwie fitopatologicznym, a mianowicie „zgnilizny”.

W punkcie 4.1.2. Doktorantka informuje o danych meteorologicznych, przedstawiając dane z trzech stacji. Moim zdaniem brakuje w tym miejscu krótkiego opisu/podsumowania jak wyglądał przebieg pogody w badanych okresach. Trudno wyciągnąć jakiegokolwiek wnioski, analizując tabelę z wartościami oraz cztery wykresy, które mogłyby być połączone w jeden zbiorczy wykres, gdzie dane przedstawione byłyby w czytelniejszy sposób niż to ma miejsce w ocenianej formie. Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku punktu 4.1.3 gdzie pani magister w dwóch tabelach przedstawia wartości badań fizyko-chemicznych wody bez jakiegokolwiek komentarza, który w tym miejscu powinien się znaleźć. Pozostawiam do dyskusji kwestię czy owe wyniki powinny znaleźć się w rozdziale poświęconym metodyce badawczej.

Podrozdział 4.2.1 poświęcony został opisowi procedur badawczych wykorzystywanych podczas izolacji grzybów. Proszę aby Doktorantka opisała jak były transportowane pobrane rośliny ze stanowiska badawczego do laboratorium? W okresie miesięcy letnich, gdy panują wysokie temperatury, zbyt długie przechowywanie materiału roślinnego może wpłynąć na uzyskane wyniki izolacji i skład gatunkowy uzyskanych kolonii grzybów. Brakuje mi informacji dotyczącej czasu odkażania fragmentów roślinnych 70% etanolem. Istnieje w tym miejscu pewna nieścisłość spowodowana zapewne pośpiechem podczas opracowywania rozprawy doktorskiej. Pani magister wymienia organy roślinne z których wykonywała izolację, pozyskując fragmenty porażonych roślin o wymiarach 30 – 50 x 30 – 50 mm. Proszę o wyjaśnienie, która część ogonka liściowego była pobierana do badań? Mając na uwadze podane przez Autorkę wymiary to chodzi zapewne o część dolną, najgrubszą? Proszę także o wyjaśnienie czy uzyskane kolonie grzybów były następnie pasażowane celem ich oznaczenia do gatunku na tzw. skosach?

Kolejne podrozdziały zostały opracowane prawidłowo, nie mam większych uwag co do ich zawartości. Proszę jednak o wyjaśnienie dlaczego do badań nad wpływem grzybów drożdżoidalnych na *Colletotrichum nymphae* zostały wykorzystane drożdże z rodzaju *Pichia*?

Cześć poświęcona wynikom została opracowana dosyć starannie. Moje zastrzeżenia budzi tabela numer 13. Brak w niej opisu co oznacza cyfra „1” przy danym gatunku grzyba oraz roślinie żywicielskiej. Czy Autorka miała na myśli występowanie danego gatunku grzyba? Jeśli tak to w takim przypadku trafniej byłoby zamiast cyfry umieścić np. znak „+” określający także liczebność. Szkoda, że ta tabela została w takim sposób opracowana bo nie jest do końca czytelna dla fitopatologa, który w tym miejscu oczekiwałby raczej frekwencji występowania danego gatunku grzyba niż samej informacji, że takson jest lub go nie ma na danym gatunku rośliny żywicielskiej. Sytuacji nie rozwiązują tabele zamieszczone w aneksie. Moim zdaniem są nieczytelne. Wydaje mi się zbędne opisywanie liczby taksonów uzyskanej z poszczególnych roślin żywicielskich, których dokonała Doktorantka w podrozdziałach 5.1. – 5.3. gdyż do opisu wystarczyłby jeden wykres, który zresztą znajduje się w pracy na stronie 45. Z punktu widzenia fitopatologicznego znacznie lepiej opracowana jest część poświęcona frekwencji i dominacji poszczególnych gatunków grzybów mikroskopowych zasiedlających nymfeidy. Autorka wymienia m. in. grzyby z rodzaju *Alternaria* czy też *Fusarium* jako te, które często występują na badanych roślinach żywicielskich. Ogromnym plusem tej części pracy są fotografie wyizolowanych z nymfeidów grzybów.

Wyniki opisujące badania nad wybranymi właściwościami grzyba *C. nymphaeae* są bardzo starannie opisane, a same przeprowadzenie tych doświadczeń wskazuje na opanowanie warsztatu laboratoryjnego przez panią magister. Moja uwaga dotyczy jedynie prośby o wyjaśnienie co Doktorantka miała na myśli, pisząc o „złym stanie” – kolonii grzybów czy zakażanej rośliny (?) na stronie 67 w podrozdziale 5.6.3, poświęconym testom patogeniczności *C. nymphaeae*.

Kolejny rozdział Doktorantka poświęciła dyskusji uzyskanych wyników w zestawieniu z wynikami badań innych badaczy. Razi nadmierne wykorzystywanie skrótów literowych nazw gatunkowych nymfeidów. Moim zdaniem jest tego zbyt dużo co znacznie utrudnia wnikliwą analizę tekstu. Wydaje mi się, że Autorka niepotrzebnie rozdzieliła akapity opisujące wpływ grzyba *Botrytis cinerea* na populację badanych roślin. Rozpoczyna opis swoich wyników w aspekcie prac innych badaczy na stronie 72, by następnie skupić się na omówieniu występowania pozostałych gatunków. Do *B. cinerea* „wraca” na stronie 74 – czy zatem nie byłoby słuszniejsze połączenie tych dwóch akapitów, które dotyczą wspomnianego gatunku grzyba? Doktorantka używa na stronie 74 pojęcia „fyllosfera” w aspekcie uzyskanych przez nią wyników. Zastosowana przez nią metoda badawcza, opisana na stronie 31, moim zdaniem uniemożliwiała dokładne i prawidłowe określenie składu gatunkowego fyllosfery. Liście odkażano 70% etanolem, a kolonie grzybów stymulowano do wzrostu w warunkach wilgotnej komory. Pragnę przypomnieć, że jedną z wielu metod izolacji grzybów zasiedlających blaszkę liściową jest chociażby metoda popłuczyn, a tego Autorka nie wykonała (lub nie zamieściła w pracy). Na stronie 75 Autorka odnosi się do uzyskanych przez nią wyników badań, pisząc: „Na tych akwenach zbiorowiska nymfeidów porastały do 70% powierzchni lustra wody, co wiąże się z rozkładem dużej ilości materii organicznej, w przypadku masowego porażenia roślin przez mykobiotę, na stosunkowo niewielkim zbiorniku”. Wydaje mi się, że zastosowany został w tym miejscu skrót myślowy. Doktorantka nie badała zdrowotności roślin w fitopatologicznym ujęciu, o czym już pisałem wcześniej, nie wiem

zatem jak rozumieć „masowe porażenie roślin”? Po drugie czy każdy gatunek grzyba poraża/infekuje rośliny? Bardziej adekwatnym sformułowaniem byłoby słowo „zasiedlające rośliny”. Proszę panią magister o ustosunkowanie się do tej uwagi. Ze zdań zamieszczonych w tej części rozprawy wysuwa się obraz grzybów, a szczególnie gatunków patogenicznych dla roślin, jako negatywnego czynnika, który może prowadzić do destrukcji ekosystemu wodnego. Proszę aby Doktorantka odniosła się do tej kwestii w aspekcie występowania patogenów roślin w środowiskach mało zmienionych przez człowieka, a takimi są niektóre z badanych zbiorników wodnych. Czy faktycznie jest to tylko rola negatywna? Odpowiedź wydaje się interesująca gdyż na końcu tej części rozprawy Autorka wysuwa wniosek o ewentualnych zaleceniach, dotyczących wykorzystania metody biologicznej w ograniczeniu patogenów nymfeidów na obszarach chronionych co moim zdaniem jest zbyt daleko posuniętym stwierdzeniem.

Część pracy zatytułowana „Wnioski” zawiera 10 punktów, które moim zdaniem są prawidłowo sformułowane lecz ułożone w nieco chaotyczny sposób. Autorka powinna w tym miejscu odnieść się do założonych celów badawczych, na które składało się (1) określenie składu gatunkowego mykobioty wpływającej na zdrowotność nymfeidów (2) wskazanie na potencjalne zagrożenia dla ichtiofauny, wynikające z obecności grzybów na nymfeidach, a także (3) określenie aktywności grzyba *Colletotrichum nymphaeae* oraz możliwości jego ograniczenia przez grzyby drożdżoidalne. Uważam, że założone cele zostały spełnione. Pani magister określiła skład gatunkowy grzybów, opisując nowe dla naszego kraju gatunki. Określiła także aktywność gatunku *C. nymphaeae* i zbadała możliwości jego ograniczenia przez grzyby drożdżoidalne. Trzeci z założonych celów, związany z potencjalnymi zagrożeniami dla ichtiofauny także został spełniony. Proszę jednak o wyjaśnienie wniosku numer 7, który brzmi „Zwiększenie udziału mykobioty w dekompozycji roślin może wpłynąć na skrócenie ich wegetacji, co stanowi zagrożenie dla rozrodu i rozwoju ryb”. Czy Autorka miała tu na myśli porażenie roślin przez grzyby patogeniczne czy rozkład tkanek przez saprotrofy?

Formalna ocena pracy

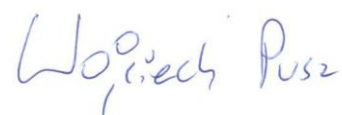
Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mieści się w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo. Praca liczy 120 strony maszynopisu, w tym 12 tabel, 15 wykresów oraz 19 zbiorów fotografii. Autorka podzieliła swoją rozprawę na 8 rozdziałów z podrozdziałami I i II rzędu, a także aneks, zawierający tabele. Kolejność pracy stanowi przemyślany układ w którym trudno znaleźć jakiegokolwiek uchybienia. Świadczy to o dobrym przygotowaniu Doktorantki do interpretacji oraz omówienia uzyskanych wyników, chociaż jak już wcześniej wspominałem Autorka powinna staranniejsze przygotować do ewentualnych publikacji część graficzną pracy w tym wykresy i tabele. Atutem rozprawy jest bogata literatura na którą składa się 274 pozycji (z czego 217 to pozycje anglojęzyczne) z których korzystała Doktorantka podczas pisania dysertacji. Sama rozprawa napisana została starannie, a stosunkowo niewielka liczba błędów natury gramatycznej i stylistycznej oraz niedociągnięcia edytorskie nie wpływają na moją pozytywną oceną formalnej strony pracy.

Wnioski końcowe

Recenzowaną pracę doktorską oceniam bardzo dobrze. Stanowi ona oryginalny, znaczący wkład w dotychczasowy dorobek naukowy w objętych badaniami zakresie. Należy podkreślić aplikacyjny charakter pracy, która może zostać wykorzystana w bioindykacji zbiorników wodnych, w hobbystycznej uprawie roślin wodnych czy wreszcie przez podmioty, zajmujące się gospodarką rybacką. Pragnę nadmienić, że Doktorantka we właściwy sposób przeprowadziła interpretację uzyskanych wyników, które następnie zestawiała z wynikami innych badaczy, a podjęty przez nią temat uważam za cenny dla badań nad grzybami mikroskopowymi w środowisku wodnym.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane kandydatom ubiegającym się o tytuł doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo, określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r., poz. 1789) oraz Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 26.09.2016 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. z 2016 r. poz 1586).

W związku z powyższym przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa, Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie wnioszek o dopuszczenie do publicznej obrony pani mgr inż. Aleksandry Rybińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Wojciech Pusz

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Rybińskiej

pt. „Mykobiota związane z nymfeidami wybranych stanowisk Pobrzeża Szczecińskiego”

1. Podstawa prawna: pismo Pani dr hab. inż. Agnieszki Tórz, prof. ZUT, dziekana Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, z dnia 22 czerwca br. dotyczące dokonania oceny poniższej rozprawy doktorskiej.

2. Ogólna ocena

Rozprawę doktorską Pani mgr inż. Aleksandry Rybińskiej oceniam bardzo wysoko. Uważam, że jest to opracowanie łączące w sposób prekursorski zagadnienia mykologii i rybactwa, umożliwiające rozpoznanie potencjalnych zagrożeń dla ichtiofauny wynikających z bytowania mykobiota na nymfeidach.

3. Uzasadnienie oceny

Recenzowana rozprawa doktorska zawiera 120 stron, podzielonych na rozdziały: Wstęp, Cel badań, Przegląd piśmiennictwa, Metody i materiał badań, Wyniki, Dyskusja, Wnioski i Piśmiennictwo, z 19 tabelami, 15 rysunkami i 19 fotografiami. W Aneksie zamieszczono 12 tabel szczegółowych, korespondujących z tabelami rozdziału Wyniki. Ponadto praca zawiera Streszczenie w j. polskim i angielskim.

Przyjęta struktura treści nie budzi zastrzeżeń, jest logiczna, kolejne rozdziały stanowią kontynuację poprzednich, a wszystkie składają się na interesującą, konsekwentną całość.

Tytuł pracy wskazuje na szeroko zakrojone podejście do oceny znaczenia hydrobiontów i roli mykobiota w funkcjonowaniu ekosystemów wodnych na wybranych stanowiskach Pobrzeża Szczecińskiego.

Wstęp i Przegląd piśmiennictwa to rozdziały zwięzłe i wartościowe, również w aspekcie dydaktycznym, w których Doktorantka jasno, z cytowaniem najnowszej angielskojęzycznej literatury, omawia rolę nymfeidów w ekosystemach wodnych, uwzględniając ich ochronę prawną oraz zastosowanie w medycynie i przemyśle, a także znaczenie mykobiota dla hydrobiontów w ekosystemach wodnych i w biologicznej ochronie roślin. Na szczególną uwagę zasługują podrozdziały dotyczące aktualnego stanu badań mykobiota związanych z nymfeidami na świecie i w Polsce, a także informacje o gatunkach grzybów i organizmów grzybobodobnych, będących pasożytami ryb. W Przeglądzie literatury Autorka zawarła wiele ciekawostek naukowych cennych dla fitopatologów, ichtiologów, botaników, entomologów, a przede wszystkim ekologów,

podkreślając rolę nymfeidów w biologii ryb, dla których tworzą schronienie i są zapleczem pokarmowym, ponadto wpływają na warunki fizykochemiczne wód, wykazują potencjał bioindykacyjny i przyczyniają się do samooczyszczania wód.

Cel pracy Doktorantka sformułowała zbyt ogólnie, wyrażając go w pierwszym punkcie jako "określenie bogactwa gatunkowego mykobiota zagrażających zdrowotności nymfeidów", co jest mało precyzyjne, gdyż nie należy zakładać w podejmowanej pracy, że wyizolujemy, wyhodujemy i oznaczymy mykobiota (mykota, mikromycetes) w ilości wskazującej na bogactwo gatunkowe, a także, że określone mikroorganizmy będą stanowić zagrożenie dla nymfeidów. W tym miejscu nasuwa się uwaga o braku w rozprawie doktorskiej hipotez badawczych.

Zastosowane metody są adekwatne do postawionych celów. Zakres prac badawczych zaplanowanych i wykonanych przez Doktorantkę był nader szeroki, a nakład pracy konieczny do zrealizowania prac terenowych i laboratoryjnych - bardzo duży. Prace prowadzone w latach 2015-2017 obejmowały badania terenowe na 15 stanowiskach (w sumie 41-krotnie), związane z oceną zdrowotności i pozyskaniem materiału roślinnego (ponad 60 prób) oraz prace laboratoryjne obejmujące izolację, hodowlę oraz identyfikację grzybów i organizmów grzybopodobnych. Autorka bardzo szczegółowo scharakteryzowała teren badań, podając m. in. cechy morfometryczne akwenów, symptomy chorób na roślinach objętych badaniami, warunki pogodowe oraz założenia ochrony przyrody na badanym terenie. W badaniach mykologicznych Autorka wykorzystała obfity materiał roślinny obejmujący ponad 2 tys. fragmentów liści grzybienia białego *Nymphacea alba*, grzybienia północnego *Nymphacea candida*, grążela żółtego *Nuphar lutea* oraz żabiścieku pływającego *Hydrocharis morsus-ranae*. W zakresie badań mykologicznych szczegółowo opisała metody stosowane do izolacji, hodowli i oznaczania mykobiota, uwzględniając kryteria taksonomiczne z kluczy mykologicznych, a także weryfikując oznaczone mykobiota w oparciu o aktualną bazę Index Fungorum. W rozdziale Materiał i metody badań Doktorantka zamieściła wskaźniki biocenotyczne dotyczące: struktury taksonomicznej, frekwencji, dominacji (struktury przestrzennej) oraz współczynnika podobieństwa gatunkowego, które we właściwy sposób zinterpretowała przy opracowywaniu wyników. Nawiązując do punktu drugiego celu badań, Doktorantka przedstawiła metody badań wybranych właściwości szczepu polskiego i holenderskiego *Colletotrichum nymphaeae*, takich, jak: tempo wzrostu, aktywność enzymatyczna i celulolityczna, a ponadto przedstawiła zasady testu patogeniczności polskiego szczepu wobec liści grzybienia białego oraz zbadała interakcje pomiędzy grzybami drożdżoidalnymi a *C. nymphaeae*.

Ustosunkowując się do treści tego rozdziału stwierdzam, że Doktorantka w sposób wyczerpujący przedstawiła zakres badań i dokładnie opisała metody, jakimi się posłużyła, a stosowane metody były poprawne i nie budzące zastrzeżeń.

Kolejne rozdziały to omówienie Wyników badań i Dyskusja. Wyniki badań zostały zaprezentowane w kolejności, jak wcześniej opisane metody i są najobszerniejszą częścią pracy. Autorka szczegółowo systematyzuje gatunki mykobiota wyizolowane z nymfeidów ekosystemów wodnych Pobrzeża Szczecińskiego. Doktorantka wykazała się bardzo dobrym przygotowaniem z zakresu mykologii, zaliczając taksony (w liczbie 72) do poszczególnych typów (Autorka posługuje się starszym określeniem - gromada). Wyróżnia wśród taksonów i grup taksonomicznych mykobiota stadia doskonałe (teleomorfy) i niedoskonałe (anamorfy), uwzględnia udział grup taksonomicznych w zbiorowiskach mykobiota, wykazując dużą ich liczebność i różnorodność gatunkową na grzybieniu białym *Nymphacea alba*, grzybieniu północnym *N. candida*, grążelu żółtym *Nuphar lutea* oraz żabiścieku pływającym *Hydrocharis morsus-ranae*. Pod rozważę Autorki, przy publikowaniu wyników rozprawy, podaje możliwość zastąpienia terminów „ogólne bogactwo, bogactwo i skład gatunkowy” terminami „obfitość i różnorodność gatunkowa”. W rozdziale tym Autorka szczegółowo podała frekwencję i dominację mykobiota na poszczególnych roślinach żywicielskich. Przedstawione wskaźniki podobieństwa mykobiota pomiędzy roślinami żywicielskimi a stanowiskami, w formie tabelarycznej i dendrogramów zasługują na rozpowszechnienie w literaturze fitopatologicznej. Generalnie, zastosowanie wskaźników biocenotycznych określających strukturę taksonomiczną, frekwencję, strukturę przestrzenną, podobieństwo składu gatunkowego mykobiota na poszczególnych stanowiskach badawczych jest kwantyfikatorem poprawności wybranych metod i właściwej interpretacji wyników badań. Godne podkreślenia jest znalezienie i zidentyfikowanie na materiale roślinnym *Hydrocharis morsus-ranae*, dotychczas nie opisanych w literaturze przedmiotu, dwu gatunków: *Tracya hydrocharidis* i *Ascochyta kirulisii* oraz udokumentowanie, że polifagiczny grzyb *Botrytis cinerea* zasiedlił grzybienie północne na Pobrzeżu Szczecińskim, które są dla niego nową rośliną żywicielską, co zasługuje na wyeksponowanie w stosownych publikacjach. W podrozdziałach dotyczących właściwości *C. nymphaeae* Doktorantka porównała tempo wzrostu szczepu polskiego i holenderskiego, wykazując zależności na różnych podłożach i w różnych warunkach termicznych oraz zbadała aktywność enzymatyczną patogena i jego patogeniczność. W badaniach wpływu *Pichia* spp. na wzrost *C. nymphaeae* wykazała ich działanie inhibicyjne wobec patogena, co nadaje pracy charakter aplikacyjny. Na wartość aplikacyjną wyników badań wskazuje też stwierdzenie, że zwiększenie udziału mykobiota w dekompozycji roślin może wpłynąć na skrócenie ich wegetacji, co stanowi zagrożenie dla rozrodu i rozwoju ryb.

W Dyskusji Autorka konfrontuje wyniki własne z danymi, jakie na ten lub zbliżony temat opublikowali inni badacze i podsumowuje, że degradacja siedlisk nie tylko ogranicza zasięg naturalnego występowania nymfeidów i wiąże się z osłabieniem kondycji roślin spowodowanym przez mykobiota, które wykazując generalizm pasożytniczy przyspieszają dekompozycje fitocenoz

i w sposób bezpośredni i pośredni wpływają na populację ryb. Istotnym spostrzeżeniem jest nawiązanie do wykazanych w badaniach zmian zdrowotności nymfeidów, powodowanych przez fitopatogeny, a zagrożeniem dla ichtiofauny poprzez zmianę warunków rozwoju ryb, w tym najczęściej notowanego obniżenia zawartości tlenu oraz zakwaszenia wód.

Wnioski sformułowane w 10 punktach wynikają w sposób logiczny z wyników wykonanych prac i są uzasadnione; jedynie wniosek 2 wymaga doprecyzowania, ma bowiem charakter wynikowy.

Literatura zawiera imponującą liczbę 281 pozycji, dobrze dobranych i wykorzystanych przy redagowaniu rozprawy.

Praca jest wykonana starannie, na dobrym poziomie technicznym, poprawna stylistycznie, zrozumiała i przekonująca. Zamieszczone tabele korespondujące z treścią są czytelne, fotografie oryginalne, a wykresy obrazują szereg zależności pomiędzy mykobiota, roślinami żywicielskimi, stanowiskami badawczymi w trzyletnim okresie badań. Tekst zawiera bogate słownictwo specjalistyczne, którym Doktorantka potrafi się swobodnie posługiwać. Duża liczba wyizolowanych, bądź wyhodowanych i oznaczonych gatunków mykobiota oraz znaczny stopień trudności w ich identyfikacji do gatunku, świadczy o bardzo dobrym warsztacie badawczym Doktorantki.

Recenzowana rozprawa doktorska, oprócz dużych walorów posiada pewne usterki i niedociągnięcia, które jednak nie obniżają jej wartości, a są nimi:

- brak postawionych hipotez,
- konieczność uaktualnienia nazw taksonów (typ = gromada), zapis nazw rodzajowych kursywą, zgodnie z Międzynarodowym Kodeksem Nomenklatury Botanicznej,
- używanie przemienne pojęć: drożdże i grzyby drożdżoidalne, co wymaga weryfikacji i zaszeregowania *Pichia fermentans* i *P. kudriavzevii* zgodnie z najnowszą systematyką, podaną aktualnie w IF, jako *P. fermentans* i *Issatchenkia orientalis*,
- rysunki i fotografie zamieszczone w pracy należy opisać jako kolejne ryciny,
- opisy bibliograficzne prac są niekiedy niekompletne, brak nazwy wydawnictwa i organizatora konferencji,
- nie zawsze są stosowane skróty czasopism naukowych, można skorzystać z ogólnie dostępnej strony Journal Title Abbreviations (https://images.webofknowledge.com/WOK46/help/WOS/A_abrvjt.html),
- w rozdziale Piśmiennictwo brakuje kilku cytowanych pozycji, bądź są zapisane w niewłaściwej kolejności.

Reasumując stwierdzam, że: całą rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko pod względem merytorycznym. Na tą ocenę składa się trafnie wybrany temat rozprawy doktorskiej, bardzo szeroki

zakres badań terenowych i laboratoryjnych, wykorzystanie właściwych metod, logiczna i merytorycznie poprawna analiza wyników badań oraz prawidłowo napisana dyskusja wyników w oparciu o obfitą literaturę, w zdecydowanej większości angielskojęzyczną. Doktorantka zrealizowała założony cel badawczy, treści rozprawy świadczą o dużej wiedzy teoretycznej i dobrym przygotowaniu naukowym oraz pracowitości Doktorantki. Rozprawa jest poprawnie przygotowana, napisana ładnym i precyzyjnym językiem, a dokumentacja naukowa pełna i przejrzysta

4. Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Aleksandry Rybińskiej zatytułowana „Mykobiota związane z nymfeidami wybranych stanowisk Pobrzeża Szczecińskiego”, przygotowana pod opieką Pani Promotor prof. dr hab. Kingi Mazurkiewicz-Zapałowicz, spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone ustawą z dnia 14 marca 2003 roku **o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki** (Dz.U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami, tekst jednolity Dz. U. 2017, poz. 1789), m.in. dlatego, że:

- stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jakim jest określenie struktury taksonomicznej i frekwencji mykobiota warunkujących naturalny przebieg dekompozycji sezonowej nymfeidów oraz determinujących ich zdrowotność, a także wskazanie na potencjalne zagrożenie ichtiofauny wynikające z obecności mykobiota na nymfeidach,
- wnosi istotny wkład do wiedzy na temat możliwości utrzymania równowagi ekologicznej poprzez ograniczenie epifitoz nymfeidów na wybranych stanowiskach Pobrzeża Szczecińskiego,
- identyfikuje i opisuje nowe fitopatogeny i rośliny żywicielskie w fitocenozach Pobrzeża Szczecińskiego,
- świadczy o umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej na wszystkich jej etapach.

Na tej podstawie wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Aleksandry Rybińskiej i dopuszczenie Doktorantki do dalszych procedur związanych z nadaniem stopnia doktora w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

Maria Kowalik

Kraków, 27.08. 2019r.

prof. dr hab. Maria Kowalik

UCHWAŁA NR 40
Senatu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie
z dnia 24 lutego 2020 r.

w sprawie nadania mgr inż. Aleksandrze Rybińskiej stopnia doktora

Na podstawie art. 179 ust. 1 i 3 pkt 2b ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. poz. 1669, z późn. zm.) w związku art 14 ust. 2 pkt 5 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz. U. z 2017 r. poz. 1789, z późn. zm.), uchwala się, co następuje:

§ 1.

Senat Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie nadaje mgr inż. Aleksandrze Rybińskiej stopień doktora w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

§ 2.

Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia.

Przewodniczący Senatu

Rektor

dr hab. inż. Jacek Wróbel, prof. ZUT