

dr hab. inż. Alina Kunicka-Styczyńska

Łódź, 5.11.2018

Ocena

pracy doktorskiej mgr Łukasza Wajdy

nt. „Identyfikacja grzybów dominujących w jabłkach oraz możliwości zahamowania ich wzrostu w napojach jabłkowych przez dodatek *Arthrospira platensis*”

wykonanej

na Wydziale Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja
w Krakowie

Promotor: dr hab. Aleksandra Duda-Chodak

Podstawa formalna

*Recenzję, której przedmiotem jest rozprawa doktorska nt. „Identyfikacja grzybów dominujących w jabłkach oraz możliwości zahamowania ich wzrostu w napojach jabłkowych przez dodatek *Arthrospira platensis*” wykonano na zlecenie Dziekana Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, zgodnie z uchwałą Rady Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, która powołała mnie na recenzenta w przewodzie doktorskim mgr Łukasza Wajdy.*

Wybór i znaczenie tematu

Jabłka należą do najpopularniejszych owoców ze względu na różnorodność smaku i wielość odmian oraz szerokie zastosowanie. Owoce te z powodzeniem można zaliczyć do grupy „żywności wygodnej”. Mogą być spożywane nieprzetworzone oraz stanowić podstawę wielu potraw lub dodatek do napojów, a odpowiednio przechowane w ciągu całego roku do następnego zbioru, praktycznie nie zmieniają swoich walorów smakowych. Jabłka są

również symbolem dobrej kondycji, a niemal wszyscy znają ich przysłowiowe dobroczynne działanie na zdrowie („An apple a day keeps doctors away”). Uznaje się, że codzienne spożycie surowych jabłek pomaga w kontroli płytki nazębnej, wspomaga organizm w walce z nowotworami, wspomaga usuwanie toksyn i metali ciężkich oraz zmniejsza wchłanianie cholesterolu. Nie bez znaczenia jest też szeroka tolerancja jabłoni na czynniki klimatyczne, co skutkuje dużym arealem upraw, nawet na Syberii i w północnych rejonach Chin, gdzie temperatury spadają do -40°C . Polska należy do grupy krajów europejskich przodujących w produkcji jabłek i jest jednym z ważniejszych eksporterów tych owoców oraz skoncentrowanego soku jabłkowego. W ostatniej dekadzie produkcja jabłek w Polsce sięgała 2,5-3,2 mln ton, a udział w krajowej produkcji wszystkich owoców wynosił około 73%.

W trosce o wysoką jakość owoców i pozyskiwanych z nich produktów, w ostatnich latach wiele uwagi poświęca się biologicznym determinantom jakości. O ile choroby drzew i czynniki je wywołujące są rozpoznane przez sadowników, to mikroorganizmy rezydujące na owocach oraz cyrkulujące pomiędzy sadami a zakładami przetwórczymi i ich wpływ na jakość soków jabłkowych nadal nie są dobrze zidentyfikowane. Dane na temat grzybów kolonizujących jabłka są fragmentaryczne, a badacze skupiają się przede wszystkim na poszukiwaniu i charakterystyce toksynotwórczych grzybów strzępkowych. Podjęty przez Pana mgr Łukasza Wajdę temat doskonale wypełnia ten nie do końca poznany obszar, a rezultaty badań stanowią cenne źródło informacji o jakościowym składzie mykobioty jabłek w Polskich sadach. Na podkreślenie zasługuje zróżnicowanie lokalizacji poboru próbek, pochodzących z sadów w trzech województwach: mazowieckim, małopolskim i świętokrzyskim, co daje szerszy pogląd na omawiane zagadnienie. Ponadto, wskazanie *Aureobasidium pullulans* jako głównego elementu mykobioty ma istotne znaczenie dla sadowników. Grzyby te są zarówno znajdowane na jabłkach z różnymi objawami zepsucia (najczęściej rudobrunatne plamy), jak i wchodzą w skład konsorcjów skutkujących powstaniem brudnej plamistości owoców (wzrost przypominający pokrycie sadzą). *Aureobasidium pullulans* uznawane są za endofity, zasiedlające tkanki roślinne, w opisywanym modelu badawczym jabłka, początkowo rozwijając się na rosnących owocach bez objawów makroskopowych, a w okresie dojrzewania powodując miejscowy rozrost tkanki korkowej owocu. Problem występowania i rozwoju tych grzybów w sadach jest nadal aktualny, co znajduje odzwierciedlenie w publikacjach w czasopismach naukowych i branżowych. W tym aspekcie widzę też potencjał publikacyjny badań opisanych w dysertacji. Za cenne w przedstawionej do oceny pracy uważam podjęcie próby zbadania możliwości kontroli wzrostu tych grzybów w niepasteryzowanych napojach jabłkowych przez dodatek preparatów pozyskanych z *Arthrospira platensis*. Uważam to za ciekawą propozycję tworzenia napoju funkcjonalnego o niskim stopniu przetworzenia.

Ocena formalna pracy

Praca doktorska Pana mgr Łukasza Wajdy obejmuje 194 strony, w tym 150 stron tekstu wraz ze streszczeniem w języku polskim i angielskim, 35 stron wykazu literatury oraz 8 stron aneksu, zawierającego szczegółowy opis procedury analizy prążków DNA w żelu agarozowym uzyskanych po rozdziale elektroforetycznym produktów reakcji PCR oraz procedurę stosowaną do uliniawiania sekwencji DNA w programie BioEdit. Dokumentacja w formie graficznej (25 rysunków) oraz tabelarycznych zestawień wyników wraz z analizą statystyczną (18 tabel) została umieszczona w opisie materiałów i metod oraz omówieniu i dyskusji wyników badań. W rozprawie wydzielono 12 głównych rozdziałów, z czego trzon stanowią: Wstęp, Przegląd literatury, Cel, Hipotezy badawcze, Materiały i metody, Wyniki i dyskusja, Podsumowanie, Wnioski, Literatura oraz Aneks. Pozostałe części to spisy skrótów stosowanych w pracy oraz streszczenia w języku polskim i języku angielskim.

Praca w sekcjach Materiały i metody oraz Wyniki i dyskusja została podzielona na cztery etapy, zgodne z tokiem przeprowadzonych badań: *I - Identyfikacja grzybów dominujących w trzech odmianach jabłek o różnym pochodzeniu; II - Identyfikacja grzybów dominujących w odmianie jabłek Koksa Górska w dwóch następujących po sobie sezonach; III - Ocena możliwości zahamowania wzrostu izolatu Aureobasidium pullulans LW14 w napoju jabłkowym przez dodatek Arthrospira platensis (warunki modelowe); IV - Ocena możliwości zahamowania wzrostu Aureobasidium pullulans LW14 w napoju jabłkowym w warunkach rzeczywistych (sok niepasteryzowany)*. Taki układ pracy znacznie ułatwia śledzenie wielowątkowych badań i prowadzi czytelnika przez poszczególne jej etapy. Połączenie wyników badań wraz z dyskusją z danymi źródłowymi nie tylko plasuje badania Doktoranta na tle literatury światowej, ale świadczy o gruntownym przygotowaniu merytorycznym Autora i szerokiej wiedzy z zakresu omawianego tematu. Tekst rozprawy został dobrze przygotowany pod względem edytorskim, a błędy literowe są nieliczne, nie zakłócają odbioru pracy i nie wpływają na wartość naukową rozprawy.

Ocena merytoryczna pracy

Jednostronicowy wstęp do pracy przedstawia zakres prowadzonych badań i poprzedza 34-stronicowy przegląd literatury. Autor obszernie i kompetentnie opisuje grupy drobnoustrojów znajdujące na owocach oraz w sokach i napojach z nich pozyskiwanych, ze szczególnym uwzględnieniem mikroorganizmów zanieczyszczających jabłko. W tej części pracy Autor używa określenia „mikroorganizmy w owocach” (s. 6, 9). Biorąc pod uwagę fakt, że zanieczyszczenia mikrobiologiczne owoców wiązane są głównie z ich osadzaniem się na powierzchni, a wnikanie do tkanek owocu jest następstwem mikrouszkodzeń tkanki,

wyjaśnienie na stronie 10 „W owocach, zarówno na ich powierzchni, jak i miąższu oraz w gnieździe nasiennym mogą występować bakterie powodujące psucie owoców...”, moim zdaniem, powinno znajdować się już w pierwszych wersach wstępu. Przegląd wybranych metod identyfikacji drobnoustrojów, obejmujący techniki klasyczne oraz nowoczesne metody instrumentalne, w tym metody biologii molekularnej, jest napisany kompetentnie i ze swadą, co wskazuje, że zagadnienie to jest w obszarze szczególnych zainteresowań Pana mgr Łukasza Wajdy. W tej sekcji znajduję również przekonujące uzasadnienie doboru biomasy cyjanobakterii *Arthrospira platensis* jako składnika napoju jabłkowego.

Cel pracy poparty hipotezami badawczymi został jasno sformułowany i w pełni przedstawia koncepcję i założenia pracy doktorskiej. Cele szczegółowe są konsekwentnie realizowane w kolejnych etapach pracy. Opis materiałów i metod badań jest wzorcowy i umożliwi odtworzenie eksperymentów w innych laboratoriach badawczych. Zamieszczenie w aneksie pracy protokołów, krok po kroku prowadzących eksperymentatora w przeprowadzaniu analizy prążków DNA w żelu agarozowym uzyskanym po rozdiale elektroforetycznym produktów reakcji PCR oraz szczegółowa procedura stosowana do ułiniawiania sekwencji DNA w programie BioEdit stanowi doskonały materiał źródłowy, który z pewnością będzie wykorzystany przez innych badaczy. Opis badań jest ułożony w logicznej sekwencji przyczynowo skutkowej, a każdy etap ma umocowanie w poprzedzających go eksperymentach. Izolację mikroorganizmów zanieczyszczających jabłka prowadzono metodami standardowymi, ale zastosowanie pożywki WL jako narzędzia przydatnego do szybkiego różnicowania *Aureobasidium pullulans* ze względu na cechy makroskopowe jest warte podkreślenia. W identyfikacji izolatów oparto się wyłącznie na metodach biologii molekularnej, co w nie dało jednak jednoznacznych wyników w przypadku kilku szczepów. W takich sytuacjach może jednak warto rozważyć użycie standardowych technik identyfikacji? Podkreślam ogrom pracy włożony podczas izolacji i identyfikacji 100 szczepów mikroorganizmów. Prowadzenie takiej kolekcji jest nie lada wyzwaniem, nawet przy zmniejszeniu liczby szczepów do 64 po kolejnych pasażach. W badaniach nad izolatami środowiskowymi zwykle ogranicza się ilość pasaży do niezbędnego minimum, aby uniknąć ryzyka zmian metabolicznych i genetycznych spowodowanych adaptacją do korzystniejszych zwykle niż w naturze warunków środowiska. Oczywiście, jak Autor rozprawy słusznie zauważa, szczepy głęboko zaadaptowane nie zachowują żywotności w warunkach laboratoryjnych. Problem ten może rozwiązać stworzenie tzw. banku szczepów, z którego izolat jest każdorazowo pobierany przed eksperymentem. Proszę o wskazanie jakie metody przechowalnicze można zastosować dla zachowania stabilności genetycznej i metabolicznej szczepów izolowanych podczas prezentowanych badań.

Oprócz grzybów *Aureobasidium pullulans*, dominujących zanieczyszczeń jabłek, po raz pierwszy udokumentowano obecność na powierzchni tych owoców toksynotwórczych kserofilnych pleśni *Penicillium commune* i *Penicillium polonicum*, dotychczas nie znajdujących w środowiskach roślinnych, co uważam za osiągnięcie tej pracy. Równocześnie, Pan mgr Łukasz Wajda postuluje wprowadzenie zmian sposobu oceny jakości jabłek (s. 77). Uwaga ta jest cenna, ale w mojej opinii wymaga poparcia szerszymi badaniami obejmującymi większą liczbę próbek pobranych w różnych regionach kraju i określenia częstości występowania tych pleśni. Jest to temat na odrębną, interesującą pracę.

W aspekcie budowy drzew filogenetycznych izolatów *Aureobasidium pullulans*, proponuję zastąpienie określenia „spokrewniony” przez „podobieństwo filogenetyczne”. Zamieszczona analiza, jak Autor stwierdza na s. 82, niekoniecznie wskazuje na bliskie pokrewieństwo izolatów ujętych w klastrach. Przy przeprowadzaniu analiz podobieństwa genetycznego izolatów środowiskowych, często tworzących konsorcja w formie biofilmów należy pamiętać o dużym zróżnicowaniu międzyszczepowym, nawet w obrębie gatunku. Drożdże i drożdżaki wykazują większą plastyczność metaboliczną w odpowiedzi na czynniki stresu środowiskowego, w porównaniu z grzybami strzępkowymi. Te ostatnie charakteryzują się zwykle szerokim aparatem enzymatycznym i wielością enzymów indukowanych, co umożliwia im przetrwanie w środowisku bez konieczności znacznych modyfikacji genetycznych. Może to tłumaczyć lepsze zróżnicowanie izolatów *Penicillium* niż *Aureobasidium*.

Aureobasidium pullulans to grzyby wykazujące znaczącą plastyczność fenotypową, co skutkuje zmianami mikroskopowymi komórek i makroskopowymi kolonii. Zależnie od czynników środowiskowych, nawet izolaty otrzymane z pojedynczych komórek mogą tworzyć kolonie o sektorach różniących się morfologicznie. Zmiany te wiązane są z czynnikami epigenetycznymi oraz szczególną adaptacją do stresowych warunków środowiska. Grzyby te uznawane są za poliektremotolerancyjne, co może tłumaczyć plastyczność ich genomu. Mogą tworzyć komórki drożdżopodobne o zróżnicowanych kształtach, strzępki, grubościennie chlamydospory, pączkujące blastospory, czy tworzące łańcuchy artrospory. Opisane na s. 89 zróżnicowanie kształtu komórek w preparacie mikroskopowym czystej kultury *Aureobasidium pullulans* jest wynikiem plastyczności morfologicznej szczepu. W badaniach homologii DNA istotne jest przygotowanie biomasy do badań. Proszę o wyjaśnienie, jaka była procedura przygotowania biomasy przed izolacją DNA.

W identyfikacji izolatów zastosowano sekwencjonowanie rybosomalnego DNA metodą Sangera oraz analizę rozmiarów amplikonów po PCR ze starterami ITS1 i ITS4. Jestem pod wrażeniem znajomości technik analizy genetycznej, biegłości analitycznej w tym

zakresie, świadomego korzystania z narzędzi bioinformatycznych w analizie molekularnej oraz umiejętności krytycznej oceny uzyskanych rezultatów. Świadomość słabych stron analizy genetycznej oraz odniesienie jej wyniku do uwarunkowań środowiskowych jest cenną cechą badacza, którą posiada Pan mgr Łukasz Wajda.

Efektom badań o potencjalnym znaczeniu aplikacyjnym jest pozyskanie puli szczepów *Aureobasidium pullulans*, wykazujących produkcję egzopolisacharydów zewnątrzkomórkowych. Ponadto, obiecujące są wstępne badania dodatku biomasy sinic *Arthrospira platensis* lub jej frakcji białkowej, jako składnika niepasteryzowanych napojów jabłkowych, zabezpieczającego ich stabilizację mikrobiologiczną. Prezentowane badania w tym obszarze mogą być podstawą do stworzenia receptury napoju funkcjonalnego na bazie tych składników.

Uważam, że zarówno wyniki badań, jak i dokumentacja je ilustrująca zostały przedstawione prawidłowo. Praca jest skonstruowana logicznie i przejrzyste, a czytelnik bez trudu podąża za tokiem badań i rozumowaniem Autora. Przytoczona bibliografia stanowi obudowę badań, dowodząc ich celowości i plasując na tle aktualnie obowiązującej wiedzy. Dysertacja zawiera 8 logicznych wniosków, sformułowanych prawidłowo, w oparciu o dane eksperymentalne i stanowiących zwięzłe konkluzje pracy.

Praca zawiera zestawienie 359 pozycji bibliografii, obejmujących zarówno pozycje kluczowe dla omawianego tematu, jak i najnowsze doniesienia naukowe. Ponad jedną czwartą piśmiennictwa stanowią pozycje pochodzące z lat 2015-2018. Spis literatury został przygotowany starannie, a drobne uchybienia edycyjne, czy niejednolite formatowanie nie utrudniają identyfikacji cytowanych źródeł.

Uwagi edytorskie

Poniższe uwagi edytorskie nie umniejszają wartości pracy i przytaczam je z obowiązku recenzenta.

- Proszę o doprecyzowanie stwierdzenia „patogeny i drobnoustroje” ze strony 7.
- W pracy Autor często używa określenia „zakażenia produktów spożywczych”, np. s. 7, 11, 20, 58, 118. Zakażenie definiowane jest jako wtargnięcie do żywego organizmu drobnoustrojów chorobotwórczych, namnażanie się i zwykle powstanie choroby. Dla produktów spożywczych proponuję użycie określenia „skażenie” lub „skażenie mikrobiologiczne”.
- Proszę o wyjaśnienie stosowania skrótów sp. i spp., np. „*Salmonella* sp., ale *Campylobacter* spp.” na stronie 8.

- Na stronie 14 zamieszczono określenie „szczepu z rodzaju *Candida*”, proszę o wyjaśnienie, czy Autor miał na myśli gatunki tych drożdży?
- Zwracam uwagę na powtarzające się w pracy błędy literowe w słowach „standard” i jego odmianach, np. na s. 20, 21, 45,46, 60, 62, 67; „Tajlandia” (s. 11, 12), czy „Holandia” (s. 46), co z pewnością wynika z automatycznych zmian wprowadzanych przez program komputerowy.
- Brak w spisie literatury pozycji Duda-Chodak i in., 2010, cytowanej na s. 35.
- Proponuję zastąpienie określenia „właściwości antygrzybiczych” przez „właściwości przeciwgrzybicze”, s. 55.
- Stwierdzenie „tolerancji szczepu na różne stężenia cykloheksymidu” jest nieprecyzyjne, aczkolwiek często używane nawet w literaturze naukowej (s. 26). Proponuję użycie „tolerancji szczepu na cykloheksymid w różnych stężeniach”.

Biorąc pod uwagę rozmiar dysertacji (194 strony), przytoczona liczba uwag jest niewielka, a usterki nie wpływają na zrozumienie i nie zakłócają odbioru pracy.

Podsumowując, stwierdzam że cel pracy oraz wszystkie sformułowane cele szczegółowe zostały w pełni zrealizowane. Praca istotnie poszerza stan wiedzy, opisując mykobiotę konsorcjów zanieczyszczających jabłka z sadów na terenie trzech polskich województw. Ponadto, po raz pierwszy wykazano obecność kserofilnych, toksynotwórczych pleśni *Penicillium commune* i *Penicillium polonicum*, dotychczas nie znajdowanych w środowiskach roślinnych. W mojej opinii walorem pracy jest również pozyskanie puli szczepów *Aureodasidium pullulans* o potencjalnych walorach aplikacyjnych. Aspekt badań dotyczących stabilizacji niepasteryzowanych soków jabłkowych z wykorzystaniem biomasy cyjanobakterii *Arthrospira platensis* stanowi nowatorskie podejście do projektowania receptur napojów funkcjonalnych o oczekiwanych walorach prozdrowotnych. Zamieszczone w tekście recenzji moje uwagi i sugestie, mają charakter dyskusyjny i nie umniejszają wartości pracy doktorskiej Pana mgr Łukasza Wajdy.

Stwierdzam, że będąca przedmiotem oceny rozprawa Pana mgr Łukasza Wajdy spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zawarte w Ustawie o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. nr 65, poz. 595) z późniejszymi zmianami (Dz. U. 2016, poz. 882) oraz w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 26 września 2016 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie

doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. 2016 poz. 1586) i przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Łukasza Wajdy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na kompleksowe podejście do postawionego celu badań oraz umiejętne wykorzystanie nowoczesnych metod identyfikacji mikroorganizmów opartych na technikach biologii molekularnej, rozprawę doktorską mgr Łukasza Wajdy oceniam jako wyróżniającą się. Wniosek o wyróżnienie wraz z jego szczegółowym uzasadnieniem przedstawiam w osobnym piśmie.

Arkadiusz Szycański

dr hab. inż. Alina Kunicka-Styczyńska

Łódź, 5.11.2018

Wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Łukasza Wajdy

nt. „Identyfikacja grzybów dominujących w jabłkach oraz możliwości zahamowania ich wzrostu w napojach jabłkowych przez dodatek *Arthrospira platensis*”

wykonanej na Wydziale Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Promotor: dr hab. Aleksandra Duda-Chodak

Zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie z wnioskiem o wyróżnienie niniejszej pracy. W mojej opinii praca zasługuje na wyróżnienie z następujących powodów:

- Praca podejmuje zagadnienie zanieczyszczenia grzybami mikroskopowymi jabłek, temat istotny zarówno z poznawczego punktu widzenia, jak i o dużym znaczeniu dla sadowników i producentów soków i skoncentrowanego soku jabłkowego.
- Przedstawione badania poszerzają i uzupełniają wiedzę w badanym zakresie. Dotychczas nie przeprowadzono tak kompleksowych badań mykobioty jabłek pochodzących z sadów w Polsce.
- Wskazanie *Aureobasidium pullulans* jako głównego elementu konsorcjum grzybów rezydujących na tych owocach oraz pierwsze doniesienia o występowaniu kserofilnych toksynotwórczych pleśni *Penicillium commune* i *Penicillium polonicum* ma istotne znaczenie dla sadowników w aspekcie zabiegów ochrony roślin przed chorobami owoców.
- Zastosowanie nowoczesnych technik do identyfikacji grzybów metodami biologii molekularnej oraz wyjątkowa biegłość Pana mgr Łukasza Wajdy w wykorzystaniu tego narzędzia diagnostycznego, ale przede wszystkim umiejętność krytycznej analizy i oceny wyników tych analiz.

Alina Kunicka-Styczyńska