

Prof. dr hab. Katarzyna Hrynkiewicz  
Katedra Mikrobiologii, Instytut Biologii  
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
Lwowska 1, 87-100 Toruń  
Tel. +48 (56) 611-25-40  
E-mail: [hrynk@umk.pl](mailto:hrynk@umk.pl)

Toruń 09.11.2024

#### **Podstawa formalna opinii**

Opinia została sporządzona dla Rady Naukowej Instytutu Badawczego Leśnictwa w Sękocinie Starym, w postępowaniu w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie nauki leśne, zgodnie z decyzją podjętą na posiedzeniu w dniu 12 września 2024 r.

#### **RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**Mgr Marty Siebyły**

**p.t. „Identyfikacja zespołów bakterii związanych z naturalnymi stanowiskami  
trufli *Tuber spp.*”**

w postępowaniu dotyczącym nadania stopnia naukowego doktora  
w dyscyplinie nauki leśne

Recenzja została przygotowana zgodnie z wymaganiami zawartymi w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz.U. z 2017 poz. 1789) oraz w oparciu o stanowisko recenzenta w sprawie dopuszczenia mgr Marty Siebyły do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

## 1. Opis ogólny

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Marty Siebyły została napisana pod kierunkiem promotora - prof. dr. hab. inż. Zbigniewa Sieroty, z Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Struktura pracy jest zgodna z ogólnymi zasadami i wymogami stawianymi rozprawom doktorskim i powstała w oparciu o cykl pięciu spójnych tematycznie prac naukowych opublikowanych w renomowanych i wysoko punktowanych czasopismach naukowych, specjalistycznych dla danej dziedziny i dyscypliny, które ukazały się w latach 2020-2024: **(P-1)** Folia Forestalia Polonica, Series A – Forestry, 2020 (MNiSW: 40 pkt / IF: 0.545) [DOI: 10.2478/ffp-2020-0012], **(P-2)** Annals of Forest Research, 2022 (MNiSW: 100 pkt / IF: 2.7) [DOI: <https://doi.org/10.15287/afr.2022.2063>]; **(P-3)** Sylwan, 2022 (MNiSW: 70 punktów / IF: 0.654) [DOI: <https://doi.org/10.26202/sylwan.2022003>], **(P-4)** Folia Forestalia Polonica, Series A – Forestry, 2021 (MNiSW: 70 pkt / IF: 0.545) [DOI: 10.2478/ffp-2021-0011], **(P-5)** Applied Soil Ecology, 2024 (MNiSW: 140 punktów / IF: 4.8) [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2024.105428>]. Łączna liczba punktów MNiSW dla powyższych prac naukowych wynosi 420, natomiast sumaryczny IF 9,244. We wszystkich tych publikacjach Pani mgr M. Siebyły jest pierwszym i jednocześnie korespondencyjnym autorem, zaś w publikacji P-3 jedynym autorem. Jak wynika z oświadczeń Doktorantka pełniła wiodącą rolę w planowaniu i wykonywaniu doświadczeń, analizie statystycznej uzyskanych wyników, przygotowaniu wykresów i tabel oraz pisaniu manuskryptów. Stosowne oświadczenia Doktorantki i pozostałych współautorów publikacji o procentowym wkładzie autorskim oraz pracach wykonywanych podczas prowadzenia doświadczeń i przygotowywaniu publikacji naukowych zostały zamieszczone w końcowej części rozprawy doktorskiej (str. 105-110). Udział procentowy współautorstwa Pani M. Siebyły wskazany w oświadczeniach dla pięciu publikacji wahał się od 70 do 100%. Liczba współautorów we wszystkich pięciu pracach nie była duża, od 1 do 3, co dodatkowo potwierdza znaczący udział Doktorantki w realizacji badań i powstawaniu publikacji.

Tytuł rozprawy odpowiada treściom zawartym w dysertacji. Rozprawa doktorska składa się z ośmiu rozdziałów obejmujących: Streszczenie (w języku polskim i angielskim), Wstęp, Cel naukowy i Hipotezy badawcze, Materiały i metody, Wyniki, Podsumowanie badań naukowych i Wnioski oraz Literatura (rozdziały te zawarte zostały na stronach 1-104). Do pracy dołączono kopie pięciu publikacji naukowych oraz oświadczenia współautorów. Na duże uznanie zasługuje szczegółowo opracowany przez Doktorantkę Słownik skrótów i pojęć stosowanych w rozprawie, który w znacznym stopniu ułatwił zapoznanie się z treściami zawartymi w pracy doktorskiej.

Głównym celem przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej było zbadanie zbiorowisk bakterii towarzyszących trufli letniej *Tuber aestivum* w różnych fazach jej rozwoju (w glebie, w korzeniach z ektomykoryzą, w owocnikach) w wybranych drzewostanach w Polsce. Badania opisane w pracy prowadzono w trzech różniących się (np. drzewostanem, glebą) lokalizacjach w makroregionie Niecki Nidziańskiej, w których wyznaczono stanowiska z potwierdzonym występowaniem trufli oraz stanowiska kontrolne (bez występowania trufli). Doktorantka postawiła sześć hipotez badawczych (str. 26), odnoszących się bezpośrednio do

zaprezentowanych w pracach P-1, P-2, P-3, P-4 i P-5 wyników badań. Założono, że gleba, w której występują owocniki trufli letniej charakteryzuje się wyższą liczebnością bakterii oraz różni się składem zespołów bakteryjnych i aktywnością procesów metabolicznych od stanowisk, w których trufia letnia nie występuje.

## **2. Znaczenie i aktualność zagadnień zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej**

*Tuber aestivum*, powszechnie znany jako trufia letnia, jest ceniony na całym świecie ze względu na swój charakterystyczny aromat i smak. *T. aestivum* należy do rodziny Tuberales (rzęd Pezizales, typ Ascomycota), dużej grupy grzybów ektomykoryzowych rosnących w symbiozie z korzeniami kilku roślin naczyniowych (okrytozalążkowych: *Betula* spp., *Carpinus* spp., *Castanea* spp., *Corylus avellana*, *Fagus* spp., *Populus* spp., *Quercus* spp. i *Tilia* spp.; nagozalążkowych: *Abies* spp., *Cedrus* spp., *Picea* spp. i *Pinus* spp.), obficie owocując w dojrzałych drzewostanach. Naturalne występowanie *T. aestivum* wykazuje szeroki zasięg w Europie, Azji i Afryce Północnej. *T. aestivum* jest kluczowym gatunkiem trufli o znaczącej wartości ekologicznej i ekonomicznej. Na występowanie trufli w środowisku naturalnym lub w plantacjach duży wpływ mogą mieć warunki klimatyczne i glebowe, np. pH, rośliny żywicielskie oraz mikroorganizmy zasiedlające glebę i korzenie roślin. Scharakteryzowanie kluczowych parametrów, które są optymalne dla rozwoju trufli letniej może mieć istotne znaczenie w uprawie tych wyjątkowych grzybów do celów konsumpcyjnych. Z tej perspektywy, badania przeprowadzone przez Doktorantkę nad identyfikacją i znaczeniem bakterii glebowych związanych z rozwojem i owocowaniem trufli letniej w Polsce są niezwykle istotne i warto zaznaczyć, że nie były jak dotąd prowadzone. Zaprezentowane przez Doktorantkę szeroko zakrojone doświadczenia przeprowadzone w warunkach naturalnych i laboratoryjnych, wykonane analizy mikrobiologiczne oraz uzyskane wyniki badań, w istotnym stopniu poszerzają wiedzę naukową w tym temacie.

## **3. Najważniejsze wyniki pracy doktorskiej przedstawione w publikacjach naukowych i ich znaczenie**

W publikacji P-1 opisano skład ilościowy i jakościowy bakterii wyizolowanych z gleby (jesienią 2016 i wiosną 2017 roku) na trzech wybranych stanowiskach w Niecce Nidziańskiej (G, M, W), w miejscach występowania trufli letniej (*Tuber aestivum*) oraz w glebie kontrolnej (bez trufli) (24 warianty doświadczenia łącznie). W badaniach zastosowano metodę klasyczną opartą na izolacji bakterii, a następnie identyfikację poszczególnych izolatów z zastosowaniem sekwencjonowania Sangera. Z 347 izolatów bakteryjnych 248 (71,5% poddano identyfikacji na podstawie sekwencjonowania regionu 16S rRNA (pozostałe nie udało się utrzymać w hodowli). Największa liczba zidentyfikowanych bakterii należała do rodzajów: *Pseudomonas* – 33% (klasa Gammaproteobacteria), *Streptomyces* -29% (Actinomycetes) i *Bacillus* – 15% (Bacilli). Niestety w pracy nie podano po ile izolatów na dany wariant doświadczenia poddano identyfikacji oraz nie podano samych wyników identyfikacji (*BLAST searching*) bakterii z numerami akcesyjnymi w NCBI. Z moich szacunkowych wyliczeń wynika, że ok. 10, co stanowi stosunkowo niewielką liczbę.

W opisie wyników (P-1, str. 114, 123) używane jest określenie „microbiome”, które w aspekcie wykorzystanych analiz uważam, że jest nieuprawnione. W mojej opinii lepiej byłoby używać takich terminów jak np. zespół/społeczność bakterii hodowlanych.

W badaniach raczej nie wykazano istotnych różnic pomiędzy liczebnością oraz zidentyfikowanymi bakteriami pomiędzy stanowiskami badanymi (z truflami) i kontrolnymi.

Za cenną w przedstawionych badaniach uważam informację, że na występowanie owocników trufli istotny wpływ ma zawartość jonów wapnia w glebie ( $\sim 42,6$  cmol/kg<sup>-1</sup> na stanowiskach z truflami i  $\sim 24,06$  cmol/kg<sup>-1</sup> na stanowiskach bez trufli – kontrolnych). Wielka szkoda, że nie dokonano korelacji pomiędzy tymi uzyskanymi wynikami. Doktorantka jest świadoma ograniczeń wynikających z zastosowanych w tej pracy metod, co opisuje w konkluzjach w pracy P-1. Ten przejaw krytycyzmu do prowadzonych badań uważam za przejaw jej dużej dojrzałości naukowej.

W publikacji **P-2** wykorzystano metody sekwencjonowania nowej generacji (NGS) do określenia metagenomu bakterii występujących w glebach leśnych, w których owocuje trufła letnia *T. aestivum*. Badania przeprowadzono wiosną 2017 r. na tych samych stanowiskach, które uwzględniono w badaniach opisanych w P-1. Badania pozwoliły określić rolę poszczególnych grup bakterii w rozwoju owocników trufli letniej, w zależności od gatunku drzewa dominującego w drzewostanie. Analiza metagenomiczna próbek DNA wyizolowanych bezpośrednio z gleby pozwoliła wyróżnić sześć dominujących klas bakterii, przy czym bakterie z klas: Chloroflexia (dawniej Cloroflexi) i Actinomycetes (dawniej Actinobacteria) występowały częściej w glebach, w których znaleziono trufle letnią ( $\sim 60\%$ ). Wielka szkoda, że w przeprowadzonych badaniach nie uwzględniono parametrów glebowych, które w znacznej mierze mogłyby poszerzyć wiedzę na temat wpływu czynników środowiskowych na różnorodność bakterii obserwowanych na stanowiskach na których występowały trufle i kontrolnych. Nie widzę również w P-2 informacji, że dane uzyskane z sekwencjonowania zostały zdeponowane w bazie NCBI.

W publikacji **P-3** założono, że liczba bakterii w miejscach, w których występują trufle, będzie różna w zależności od obszaru (zbiorowiska drzewostanu) oraz że poziom aktywności procesów metabolicznych w wariacie kontrolnym będzie niższy niż w wariacie, w którym rosną trufle. Próby do badań pobrano (dla tych samych stanowisko co w P-1 i P-2) wiosną 2017 r., zaś badania przeprowadzono w oparciu o analizę qPCR, umożliwiającą określenie liczebności bakterii w badanych próbkach gleby oraz system BIOLOG<sup>TM</sup>, określający funkcjonalną różnorodność bakterii w oparciu o wykorzystywanie 31 źródeł węgla (płytki EcoPlates). Istotne różnice w liczebności bakterii stwierdzono na stanowiskach M i W, jednak były to dane wskazujące, że liczba bakterii na stanowiskach, na których występuje trufła i kontrolnych, zależy od stanowiska (prawdopodobnie od czynników środowiskowych). Tego typu analiz niestety w pracy nie zaprezentowano. Aktywność metaboliczna mikroorganizmów na stanowiskach G, i M była wyższa w glebie kontrolnej (pozbawionej *T. aestivum*), co może wskazywać, że wysoka aktywność drobnoustrojów ogranicza wzrost trufli. Badania te nie przyniosły jasnych odpowiedzi. Wynikać to może z faktu, że badania przeprowadzono tylko w jednym sezonie (wiosna) i tylko w jednym roku (2017), co znacznie ograniczyło analizę powtarzalności uzyskanych wyników, a co za tym idzie możliwość trafnego wnioskowania. W mojej opinii, warto rozważyć w przyszłości eksperymenty, które będą obejmowały większą liczbę sezonów wegetacyjnych do tego typu badań.

Publikacja **P-4** łączy w sobie metodykę opisaną w P-1 (oznaczanie liczebności bakterii metodą płytkową, izolację i identyfikację otrzymanych izolatów bakteryjnych metoda Sangera) oraz P-3 (oznaczanie różnorodności bakterii metodą NGS). W pracy tej analizowane

są korzenie drzew z 6 opisanych we wcześniejszych publikacjach (P1-P4), które pobierano w 2 sezonach (wiosna, jesień) w 2017 i 2018 r (analizę NGS wykonano jedynie w roku 2018). W eksperymencie tym zidentyfikowano stosunkową niewielką liczbę bakterii przypadającą na jeden wariant eksperymentu (162 zidentyfikowane bakterie na 24 warianty doświadczenia, co daje ok. 7 izolatów na wariant). Niestety w pracy nie podano ile dokładnie szczepów na dany wariant doświadczenia zanalizowano. Podobnie jak w P-1 nie podano wyniku identyfikacji BLAST, nie ma numerów akcesyjnych sekwencji oraz informacji, że dane zostały zamieszczone w Bazie NCBI. Uzyskane wyniki wskazały, że bakterie z rodzaju *Bradyrhizobium* wyizolowane z korzeni były obecne tylko na stanowiskach z truflami, tymczasem sekwencjonowanie NGS wykazało występowanie tych bakterii tylko w wariantcie kontrolnym. Może to wynikać z faktu, że badania NGS przeprowadzono tylko w jednym sezonie w roku 2018. Badania wykazały, że istnieją różnice pomiędzy bakteriami obecnymi w korzeniach, a tymi które zasiedlają otaczającą je glebę (porównanie z wynikami uzyskanymi we wcześniejszych pracach).

W publikacji P-5 zaprezentowano wyniki analiz różnorodności bakterii w owocnikach *T. aestivum*, wykonane oparciu o NGS (w latach 2017 i 2018, w 2 sezonach: wiosna i jesień) oraz klasyczne metody izolacji i identyfikacji bakterii (w roku 2017), wykonane na 6 stanowiskach badawczych opisanych we wcześniejszych publikacjach (P-1 – P-4). Ze wszystkich izolatów bakterii (164 łącznie) uzyskanych z owocników do identyfikacji wybrano 103 izolaty (107 z roku 2017 i 30 z roku 2018) do identyfikacji na podstawie 16S rRNA. Wyniki uzyskane w oparciu o metodę NGS wykazały, że różnorodność zespołów bakterii zasiedlających owocniki *T. aestivum* zależy od stanowiska badawczego (np. gatunku rośliny żywicielskiej, parametrów fizyko-chemicznych gleby), które mogą mieć wpływ na tworzenie symbiozy oraz owocników. Pracę tę uważam za najbardziej cenną spośród 5 publikacji stanowiących podstawę tej dysertacji. Przedstawia wyniki łączące dwie metody badawcze stosowane w mikrobiologii, klasyczną (opartą na wyizolowanych i zidentyfikowanych bakteriach, które mogą posłużyć do dalszych badań) oraz metagenomiczną (NGS) (opartą na całkowitym DNA wyizolowanym z korzeni lub owocników).

#### **4. Podsumowanie**

Badania przeprowadzone przez Doktorantkę w ramach pracy doktorskiej mogą przyczynić się do zachowania gatunku trufli w warunkach naturalnych oraz promocji i komercjalizacji trufli w Polsce. Korzystny wpływ bakterii na trufle stwarza również potencjał do inokulacji siewek drzew odpowiednimi izolatami bakterii podczas produkcji materiału mykoryzowanego/nasadzeniowego. Praca doktorska mgr Marty Siebyły stanowi zbiór oryginalnych prac przedstawiających nową i przydatną wiedzę z zakresu badań nad bakteriami, które mogą przyczyniać do rozwoju symbiozy mykoryzowej na korzeniach drzew oraz powstawania owocników trufli. Uzyskane przez Doktorantkę izolaty bakteryjne mogą znaleźć szerokie zastosowanie w leśnictwie, szkółkarstwie i tworzeniu nowych stanowisk do uprawy trufli. Doświadczenia przeprowadzono przy użyciu zróżnicowanych i dobrze dobranych technik laboratoryjnych. Wyniki przedstawiają szeroki i dobrze zaprezentowany zestaw wyników badań, które w publikacjach naukowych zostały dokładnie przeanalizowane i omówione na podstawie dostępnej literatury naukowej. Rozprawa doktorska została poprawnie napisana pod względem redakcyjnym.

## 5. Uwagi

Etap przygotowywania i pisania rozprawy doktorskiej to pierwszy krok młodego naukowca na jego drodze do dalszej kariery naukowej. Na tym etapie mogą pojawiać się pewne niedociągnięcia, które z pewnością w przyszłości zostaną wyeliminowane. Dlatego też sugestie, które wymieniam poniżej mają na celu zwrócenie Doktorantce uwagi na nieco słabsze strony pracy doktorskiej, tak aby mogła udoskonalić w przyszłości swój warsztat badawczo-naukowy i z sukcesem osiągać kolejne, niezwykle ważne cele naukowe.

1. Praca doktorska (np. str. 16, 19, 22) oraz publikacje zawierają nieaktualne nazwy niektórych typów (phyla) bakterii. Na przykład „Firmicutes” powinny zostać zaktualizowane do „Bacillota”, podobnie jak „Chloroflexi” do „Chloroflexota”, „Proteobacteria” do „Pseudomonadota”, „Bacteroidetes” do „Bacteroidota”. Warto uwzględnić tę uwagę w przyszłych analizach bioinformatycznych oraz publikacjach naukowych, aby prowadzone badania odzwierciedlały obecne standardy taksonomiczne.
2. Wstęp pracy doktorskiej oraz P-1 zostały opracowane w oparciu o stosunkowo małą liczbę pozycji literaturowych, które zostały opublikowane w ostatnich 5-10 latach. Uwzględnianie w przeglądzie literatury i dyskusji uzyskanych wyników najnowszych doniesień naukowych znacząco wpływa na zwiększenie rangi i aktualności powstających prac. Może się to również wiązać z odnoszeniem się w opisach do nieaktualnych nazw niektórych grup taksonomicznych, co wskazano w uwadze powyżej.
3. We Wstępie pracy (str. 17) wprowadzono definicję „mikrobiomu” w oparciu o literaturę z 1990 roku, określając, że mikrobiom tworzą mikroorganizmy wpływające korzystnie, obojętnie lub negatywnie na roślinę. W „Słowniku skrótów i pojęć stosowanych w rozprawie” (str. 11) opisano natomiast „mikrobiom” jako „zespół/zbiorowisko bakterii zasiedlających daną próbkę”. W mojej opinii nie jest to opis precyzyjny i powinien być zweryfikowany o najnowsze publikacje naukowe definiujące to określenie. Mikrobiom to charakterystyczny zespół mikroorganizmów (również np. grzyby) o określonych aktywnościach, zajmujący dobrze zdefiniowane siedlisko, które ma odrębne właściwości fizykochemiczne.

Drobne uwagi:

4. Podczas obrony pracy doktorskiej bardzo proszę o wyjaśnienie dlaczego w doświadczeniach opisanych w P-1, P-4 i P-5 część izolatów uznano za niehodowalne i nie poddano ich identyfikacji na podstawie 16S rRNA.
5. W oparciu o aktualne dane z NCBI, Glomeromycotina to podtyp, zaś Glomeromycetes to klasa (str. 18).
6. *Tuber melanosporum* wg najnowszej klasyfikacji systematycznej należy do typu Ascomycota, a nie Ascomycetes (np. str. 19).
7. Powinno być „mykoryz”, a nie „mikoryz” (str. 21).
8. Na Rycinie 6 (str. 28) dla powierzchni M wprowadzono te same symbole (MK) dla sześciu badanych stanowisk.

## 9. Wnioski

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Marty Siebyły przedstawia szeroko zakrojone i dobrze zaprezentowane wyniki badań, co wpływa na jej ogólny bardzo wysoki poziom merytoryczny. Liczba moich uwag jest niewielka i nie wpływa na ogólną **bardzo dobrą** ocenę pracy. Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska 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 (t.j. Dz.U. z 2017 poz. 1789). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Badawczego Leśnictwa w Sękocinie Starym o dopuszczenie mgr Marty Siebyły do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki leśne.

Jednocześnie, zwracam się do Członków Rady o **wyróżnienie pracy doktorskiej** mgr Marty Siebyły za podjęcie się pracy naukowej nad niezwykle ważnym zagadnieniem, które może mieć istotny wpływ na rozwój wiedzy naukowej w dyscyplinie nauki leśne, dużą dojrzałość naukową i samodzielność w przeprowadzeniu eksperymentów i przygotowywaniu publikacji naukowych.

Prof. dr hab. Katarzyna Hrynkiewicz

