



Kraków, 12 listopada 2022

Recenzja pracy doktorskiej

Introduction to bioaugmentation with microorganisms capable of degrading herbicides and herbicidal ionic liquids as a factor conducive to herbicide resistance spread

wykonanej przez Panią mgr. inż. Wiktorię Małgorzatę Wilms
pod kierunkiem Prof. dr hab. Łukasza Chrzanowskiego

Wydział Technologii Chemicznej
Politechnika Poznańska

Recenzowana praca porusza ważne dla środowiska problemy tj. rozkładu herbicydów i herbicydowych cieczy jonowych wykorzystując mikroorganizmy, które mają wysoką zdolnością do przetworzenia zanieczyszczeń w skażonym środowisku. W procesie bioaugmentacji wykorzystywane mikroorganizmy powinny być nieszkodliwe dla człowieka i samego środowiska. W szczególności jednak niniejsza rozprawa opisuje wyniki badań właściwości biologicznych herbicydowych cieczy jonowych, które są alternatywną formą herbicydów i nie wymagają stosowania adiuwantów.

Praca została wykonana pod opieką znakomitego specjalisty, Pana Prof. dr hab. Łukasza Chrzanowskiego, który od lat zajmuje się problemami degradacji związków szkodliwych dla środowiska, śledzeniem i badaniem mechanizmów procesów degradacji. Taka opieka i praca w laboratorium odpowiednio wyposażonym jest gwarancją wysokiej jakości badań, rzetelności analiz opartych na najnowszej wiedzy, z wykorzystaniem odpowiednich metod badawczych.

OGÓLNA OCENA ROZPRAWY

Praca napisana jest w języku angielskim, w formie monografii. Oparta jest na 4 publikacjach, w których Pani Wilms jest pierwszym autorem (2), drugim autorem (1) i jednym z autorów (1). Kolejna praca, gdzie Doktorantka jest pierwszym autorem jest w recenzji w *Chemosphere*. Publikacje te są wynikiem badań w ramach grantu OPUS NCN, którym kierował Pan Prof. dr hab. Łukasz Chrzanowski, a Pani Wilms była wykonawcą ze statusem doktoranta. Nie mam wątpliwości, że Doktorantka ma w tych badaniach wiodącą rolę. Wszystkie publikacje są na liście JRC i mają wysoki współczynnik oddziaływania (*impact factor*, IF) pomiędzy 3,5 a 9,2. Sumarycznie IF dla tych prac wynosi 25,906 (nie licząc pracy w recenzji).

Monografia liczy 155 stron, napisana jest poprawnym językiem, wzbogaconym o liczne rysunki i tabele. Otwierają ją podziękowania, informacja o prawie do przedruku treści umieszczonych w dwóch publikacjach i finansowaniu badań, po czym znajduje się spis treści. Część wstępna i cele zajmują pierwsze 26 stron, zaś opis materiałów i metod to kolejne 40 stron. Wyniki i ich dyskusja zawarta jest na 56 stronach, posumowanie i rekomendacje na przyszłość to kolejne 7 stron. Po bibliografii liczącej 253 pozycje, licie skrótów, spisie rysunków i tabel, zamieszczono informacje o aktywności naukowej Doktorantki.

Część wstępna jest dość zwięzła i skupia się na opisie produktów ochrony roślin, herbicydowych cieczy jonowych i badaniach środowiskowych tych cieczy. Powszechnie uważa się, że herbicydowe ciecze jonowe to alternatywa dla herbicydów stosowanych z adiuwantami, obniżającymi napięcie powierzchniowe wody, dzięki czemu herbicyd lepiej pokrywa opryskiwaną powierzchnię, a substancja aktywna preparatu chemicznego lepiej wnika do rośliny. Adiuwanty mają więc korzystny efekt przy stosowaniu herbicydów, ale mogą też powodować skutki uboczne. Z kolei herbicydowe ciecze jonowe badane są dość intensywnie w kierunku nowych metod syntezy i właściwości fizykochemicznych, ale prace naukowe dotyczące właściwości biologicznych są dość ograniczone.

Rozdział zatytułowany *Cele pracy, de facto* podaje trzy hipotezy badawcze tj. 1/ herbicydowe ciecze jonowe działają jako mieszanina kationów i anionów, a ich degradacja przypomina rozpad herbicydów w procesie kationowych surfaktantów; 2/ obecność powierzchniowo-aktywnych kationów w herbicydowych cieczach jonowych powoduje wzrost toksyczności i jest związana z transmisją genów odpornościowych; 3/ bioaugmentacja z wybranymi bakteriami mającymi zdolność degradacji herbicydów powoduje zwiększoną efektywność procesu degradacji, prowadząc do zaniku toksycznego wpływu kationów. Hipotezy te weryfikowano w

ramach projektu OPUS NCN i recenzowanej pracy, która jest efektem końcowym tych badań. Hipotezy są jasno sformułowane, brakuje jednak wskazania celów do realizacji, choć oczywistym jest, że są one powiązane z postawionymi hipotezami.

Opis *Metod i materiałów* jest bardzo szczegółowy i odzwierciedla zakres wykonanych eksperymentów. Synteza i badania przeprowadzono dla herbicydowych cieczy jonowych opartych na anionie glifosatowym, kwasie 2,4-D, MCPA i dikambie (podaje skróty stosowane w pracy, ich rozwinięcie jest na *Liście skrótów*). Tropina została zaproponowana jako tanie i zrównoważone źródło kationu regulującego wzrost roślin. Otrzymano związki z wysoką wydajnością, a preparaty wykazywały wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec pospolitych bakterii glebowych *Pseudomonas putida* i *Bacillus cereus*.

Wyniki i dyskusja dotyczy wpływu herbicydowych cieczy jonowych na środowisko oraz efektywności bioaugmentacji i wpływu na niezamierzone nabycie odporności herbicydowej. Doktorantka pokazała, że wprowadzenie do środowiska surfaktantów kationowych i anionów herbicydowych, które tworzą herbicydowe ciecze jonowe, prowadzi do ich odrębnej i odmiennej degradacji. Duże hydrofobowe kationy o właściwościach powierzchniowo-czynnych są toksyczne dla mikroorganizmów glebowych, podobnie jak dla roślin. Pogarszają one efektywność degradacji anionów i powodują wzrost toksyczności mikrobiologicznej. Nie zaleca się więc stosowania surfaktantów kationowych w strukturze herbicydowych cieczy jonowych, ponieważ jony działają jako oddzielne ugrupowania. Jeśli kation ma toksyczne właściwości to będzie on miał wpływ na cały związek powodując również wzrost jego toksyczności.

Interesujący problem badawczy, który postawiła sobie Doktorantka to sprawdzenie czy jest możliwe zwiększenie hydrofobowości rozpuszczalnego, łatwo wypłukiwanego anionowego herbicydu, 2,4-D, łącząc go z betainą. Byłoby to ważne z punktu widzenia losu środowiskowego herbicydów. Pokazano, że adsorpcja w glebie rolniczej była odpowiednio na poziomie 87–95% dla hydrofobowego oraz 3% dla hydrofilowego jonu. Adsorpcja anionów [2,4-D] była minimalna, co wskazuje na brak statystycznego wpływu hydrofobowości kationów na sorpcję anionów. Potwierdziły to również widma $^1\text{H}-^1\text{H}$ NOESY i obliczone energie interakcji między jonami. Badania toksyczności, metabiому ryzosfery i fitotoksyczności potwierdziły dominującą rolę hydrofobowych powierzchniowo czynnych pochodnych betain.

Korzystny wpływ bioaugmentacji z zastosowaniem mikroorganizmów wyspecjalizowanych w degradacji glifosatu był widoczny w przypadku zwiększonej efektywności mineralizacji herbicydowych cieczy jonowych oraz w działaniu ochronnym na stres oksydacyjny w roślinach. Doktorantka podkreśla, że parametry kinetyczne biodegradacji pochodzące z eksperymentów przeprowadzonych w

środowisku wodnym nie powinny być wykorzystywane do szacowania szybkości biodegradacji w glebie. Testy laboratoryjne (rozszerzone o badania w szklarni) przeprowadzono wykorzystując znakowane kationy i aniony ($[C^{12}\text{-BA}][\text{MCPA}]$). Doktorantka wykazała, że bioaugmentacja zwiększyła aktywność genetyczną związaną z degradacją wybranych herbicydów, a warunki stresowe prawdopodobnie mogą sprzyjać niezamierzonemu transferowi genów i nabywaniu odporności na herbicydy.

Tym samym, Doktorantka pozytywnie zweryfikowała postawione na wstępie pracy 3 hipotezy i pogłębiła wiedzę o losie i wpływie herbicydowych cieczy jonowych na środowisko.

PODSUMOWANIE

Praca została starannie zaplanowana i zrealizowana. Również opis wyników jest przejrzysty i zasadniczo nie mam uwag. Formalnie nie sformułowano celów pracy, ale postawiono hipotezy badawcze. Niektóre tabele (na str. 110 i kolejnych) wydają się być zamieszczone do góry nogami, choć po obróceniu pracy są w pełni czytelne.

Podsumowując, Doktorantka pokazała, że kationy i aniony w herbicydowych cieczach jonowych zachowują się jak oddzielne ugrupowania. Pokazała, że nietoksyczny anion w parze z powierzchniowo-aktywnym kationem tworzą związek, który jest znacząco bardziej toksyczny dla mikroorganizmów, a wyższa toksyczność mikrobiologiczna oznacza niższą efektywność biogeneracji. Pokazała, że wyeliminowanie adiuwantów i zastosowanie kationów pochodzenia naturalnego niekoniecznie prowadzi do związków przyjaznych środowiskowo. Wykorzystując metodę znakowania izotopowego pokazała, że kationy i aniony ulegają degradacji w odmienny sposób. Wskazała, że dla wiarygodnej oceny degradacji herbicydowych cieczy jonowych ważny jest odpowiedni wybór mikroorganizmów i środowiska dla prowadzonych testów. Co więcej, Doktorantka sugeruje potrzebę lepszej definicji herbicydowych cieczy jonowych, gdyż wiele z wcześniej opisanych takich związków nie było już związkami po ich wprowadzeniu do środowiska, a zamiast tego stawały się niezależną mieszaniną jonów. Po lekturze pracy, wydaje się więc, że herbicydowe ciecze jonowe to niezbyt korzystna alternatywa dla herbicydów... taki wniosek nie został jednoznacznie sformułowany, poproszę o komentarz co powstrzymało Doktorantkę przed postawieniem tak jednoznacznej konkluzji.

Przedstawiona rozprawa Pani mgr. inż. Wiktorii Małgorzaty Wilms spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim. Jej pionierskie badania wykazały, że herbicydowe ciecze jonowe mają określony i istotny wpływ na środowisko. Wyniki opisane w pracy doktorskiej zostały również opublikowane w bardzo dobrych

czasopismach o zasięgu międzynarodowym, wypełniając lukę w obecnym stanie wiedzy o herbicydowych cieczach jonowych. Doktorantka brała udział w licznych konferencjach naukowych aktywnie prezentując wyniki. Nie mam wątpliwości, że zarówno praca doktorska jak i dorobek naukowy Jej Autorki zasługuje na wyróżnienie.

Podsumowując, uważam, że złożona rozprawa doktorska spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w *Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki z 14 marca 2003 (Dz.U. z 2017 r. poz.1789 z późn. Zmianami) w związku z 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) i wnioskuje o dopuszczenie Pani Wiktorii Małgorzaty Wilms do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę zakres przeprowadzonych badań, ich pionierski charakter, w szczególności wykazanie mechanizmu biologicznego działania herbicydowych cieczy jonowych, kompleksowa i dogłębna analiza, opublikowane liczne prace, wnoszę o wyróżnienie pracy.*

U. Barańska