

Łódź, dnia 18.11.2022 r.

Dr hab. Przemysław Bernat, prof. UŁ
Uniwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej
i Biotechnologii UŁ

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Wiktorii Wilms

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

Podstawa formalna opinii

Opinia została sporządzona dla Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej zgodnie z decyzją podjętą na posiedzeniu w dniu 11 października 2022 r.

Recenzja została przygotowana w oparciu o wymogi określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce oraz stanowisko recenzenta w sprawie dopuszczenia mgr inż. Wiktorii Wilms do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

1. Opis ogólny

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Wiktorii Wilms została napisana pod kierunkiem prof. dr hab. Inż. Łukasza Chrzanowskiego, będącego pracownikiem Zakładu Chemii Organicznej Instytutu Technologii i Inżynierii Chemicznej Politechniki Poznańskiej.

Badania naukowe zaprezentowane w rozprawie doktorskiej mgr inż. Wiktorii Wilms zostały przygotowane i sfinansowane w ramach Grantu NCN: Opus 15 „Bioaugmentacja bakteriami degradującymi herbicydy jako potencjalny czynnik sprzyjający rozprzestrzenianiu odporności na herbicydy wśród roślin” (Nr projektu 2018/29/B/NZ9/01136), którego kierownikiem jest prof. dr hab. Inż. Łukasz Chrzanowski. Struktura pracy jest zgodna z ogólnymi zasadami i wymogami stawianymi rozprawom doktorskim.

Przedstawiona do oceny praca doktorska została prawie w całości napisana w języku angielskim (poza streszczeniem w języku polskim). Rozprawa ma strukturę typową dla prac doktorskich przygotowanych na zasadzie monografii. Obejmuje łącznie 155 stron tekstu, w skład którego wchodzi wykaz źródeł finansowania, streszczenie w języku polskim oraz angielskim, wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki i dyskusja, podsumowanie i wnioski, rekomendacje i kierunki na przyszłość, wykaz skrótów i literatura.

Wstęp jest dobrze przygotowanym rozdziałem pracy doktorskiej, obszerny przegląd literatury wprowadza w dziedzinę naukowych zainteresowań Doktorantki. Rozdział ten został podzielony na podrozdziały w których Doktorantka opisuje powszechne stosowanie herbicydów w rolnictwie europejskim, ze szczególnym uwzględnieniem pochodnych kwasu fenoksyoctowego (kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D) i kwasu 4-chloro-2-metylofenoksyoctowego (MCPA)), glifosfatu i dikamby. Autorka zwraca także uwagę na występujące negatywne skutki chemicznej ochrony roślin. Następnie Doktorantka podejmuje temat herbicydowych cieczy jonowych (ang. herbicidal ionic liquids, HILs), związków, których koncepcja została opracowana

i opublikowana w 2011 roku w wyniku współpracy naukowców Politechniki Poznańskiej i Instytutu Ochrony Roślin w Poznaniu. Autorka prezentuje najważniejsze informacje związane z budową tego typu związków oraz zaznajamia czytelnika z ich właściwościami, determinowanymi obecnością anionu o właściwościach herbicydowych i kationu organicznego o dobrych właściwościach powierzchniowo czynnych. Doktorantka szczególną uwagę poświęca kationom, zwitterionom oraz związkom organicznym należącym do grupy czwartorzędowych soli amoniowych (ang. quaternary ammonium compounds, QACs). Ostatni podrozdział wskazuje brak wystarczającej wiedzy jaką dysponujemy aby móc prawidłowo scharakteryzować właściwości biologiczne nowo otrzymanych herbicydowych cieczy jonowych i ich wpływ na mikrobiom glebowy.

Należy podkreślić, że Wstęp zawiera liczne rysunki (10 pozycji) i tabele ułatwiające zaznajomienie z informacjami związanymi z tematyką rozprawy doktorskiej.

Kolejna część rozprawy została poświęcona prezentacji celów pracy. Doktorantka stawia hipotezy, które można streścić następująco:

- Herbicydowe cieczy jonowe w środowisku zachowują się jak odrębne kationy i aniony, stąd ich degradacja może przypominać rozkład herbicydów w obecności kationowych surfaktantów.
- Obecność kationów o właściwościach powierzchniowo czynnych w herbicydowych cieczach jonowych będzie skutkować zwiększoną toksycznością, wynikającą głównie z obecności czwartorzędowych soli amoniowych
- Bioaugmentacja bakteriami zdolnymi do degradacji herbicydów, spowoduje poprawę efektywności biodegradacji.

Stosowana do realizacji zamierzeń metodyka badań nie budzi zastrzeżeń. Szeroki zakres użytych metod i technik badawczych jest niewątpliwie atutem recenzowanej pracy doktorskiej. Najobszerniejszy rozdział w pracy zawiera m. in. informacje o sposobie syntezy herbicydowych cieczy jonowych, charakterystyce stosowanej gleby, sposobach izolacji drobnoustrojów. Dużo uwagi Autorka poświęca opisowi eksperymentów z użyciem izotopu węgla ^{13}C i wykorzystaniu tej techniki do badań mineralizacji

i degradacji HILs. Autorka nie zapomina także o opisie metod chromatograficznych i spektrometrii mas. Pani mgr W. Wilms stara się także w przystępny sposób zaznajomić czytelnika z metodami użytymi do oceny toksyczności HILs wobec siewek kukurydzy, chabra i jęczmienia jarego. Doktorantka podjęła się także charakterystyki bioróżnorodności zespołów mikroorganizmów zasiedlających glebę w trakcie bioaugmentacji środowiska skażonego glifosfatem lub 2,4-D w formie cieczy jonowej, wykrywanych na podstawie sekwencji nukleotydowej genu 16S rRNA. Autorka opisała również eksperymenty szklarniowe i polowe z użyciem roślin i sposoby oznaczeń stresu oksydacyjnego u roślin. Podsumowaniem tego działu rozprawy doktorskiej jest krótko omówiona analiza statystyczna stosowana w pracy.

Rozdział wyniki i dyskusja przedstawiony jest w logiczny sposób w odniesieniu do opisu metodycznego wcześniejszego rozdziału. Kolejne części omawianych wyników i dyskusji rozpoczynają się od schematów badawczych zaznajamiających czytelnika z kolejnością poszczególnych eksperymentów wchodzących w skład poszczególnych etapów części wynikowej. W sumie Autorka podzieliła tę część pracy na 6 fragmentów.

Na podstawie otrzymanych wyników wykazano, że toksyczność HILs z anionami MCPA i dikamba względem modelowych drobnoustrojów glebowych (*Bacillus cereus* i *Pseudomonas putida*) przede wszystkim zależy od rodzaju kationu należącego do grupy czwartorzędowych soli amoniowych i wpływa na biodegradację HILs.

Stosując w badaniach izotop ^{13}C wykazano, że kationy i aniony są różnie mineralizowane w zależności od środowiska (wodnego lub lądowego) a rozwijając doświadczenia o technikę chromatografii i spektrometrii mas stwierdzono, że anion ulegał degradacji, a następnie mineralizacji, natomiast w przypadku kationu następowała jedynie biotransformacja. Bardzo interesującym wynikiem była obserwacja, że w fosfolipidach drobnoustrojowych identyfikowano tylko izotop ^{13}C pochodzący z anionów.

Obserwując sorpcję HILs w glebie Autorka wnioskuje, że kationy w HILs nie mają statystycznie istotnego wpływu na adsorpcję anionów w glebie, a w rzeczywistości są

one adsorbowane niezależnie. Stosując analizę sekwencji nukleotydowej 16S rRNA wykazano także, że HILs oddziałują na mikrobiom ryzosfery przede wszystkim ze względu na kation.

Doktorantka zwróciła także uwagę, na fakt, że degradacja herbicydowego anionu może zależeć od obecności kationu i jego właściwości, hipotezę tę poparła wynikami degradacji i mineralizacji HILs z anionem glikofosfatowym. Ten etap pracy doktorskiej rozwinięto stosując metody biologii molekularnej. Wykazano, że herbicydy wpływają na skład drobnoustrojów w glebie i częstotliwość występowania genów (*soxA* and *phnJ*) związanych z biodegradacją glikofosfatu.

Analogiczne doświadczenia przeprowadzono z HILs zawierającymi anion 2,4-D. Stwierdzono, że właściwości kationu wywierają kluczowy wpływ na proces wydajnej biodegradacji w trakcie bioaugmentacji. Potwierdzono również istotny wpływ bioaugmentacji na wzrost liczby genów *tfdA* (odpowiedzialnych za biodegradację 2,4-D) w puli genowej mikroorganizmów glebowych.

W ostatniej części omawianych wyników Doktorantka określiła wpływ różnych HILs na rośliny, a także rolę bioaugmentacji w skutecznym oddziaływaniu herbicydów jak i składzie drobnoustrojów zasiedlających rośliny i ich otoczenie. Stwierdzono, analizując m. in. aktywność katalazy czy poziom MDA, że bakterie stosowane w bioaugmentacji mogą mieć działanie ochronne, łagodząc stres oksydacyjny wywołany przez herbicyd.

Na zakończenie rozprawy doktorskiej umieszczony jest opis aktywności naukowej Doktorantki, który obejmuje wykaz 4 prac naukowych przygotowanych na bazie wyników zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej i opublikowanych w recenzowanych czasopismach z listy filadelfijskiej. Natomiast na całkowity dorobek naukowy Doktorantki składa się 5 publikacji o sumarycznym IF=31,014 oraz 20 doniesień konferencyjnych.

2. Znaczenie i aktualność zagadnień zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej

Obecnie podstawową metodą ochrony roślin uprawnych przed chwastami i obniżeniem wydajności produkcji jest stosowanie syntetycznych związków chemicznych. Ich powszechność użycia wywiera negatywne skutki na środowisko przyrodnicze, dlatego poszukuje się nowych rozwiązań w walce z chwastami. Uważa się, że alternatywą wobec klasycznych herbicydów może być zastosowanie herbicydowych cieczy jonowych, czyli związków będących połączeniem anionu o właściwościach herbicydowych i kationu organicznego. Herbicydowe ciecze jonowe są coraz dokładniej opisywane pod kątem ich właściwości fizykochemicznych i skuteczności chwastobójczej, niewiele natomiast jest badań dotyczących właściwości biologicznych tych związków. Tymczasem, szczególnie mając na uwadze zamiar wprowadzenia tych związków na skalę masową na pola uprawne, należy zwrócić uwagę na braki w obecnym stanie wiedzy o HILs. Aktualne informacje na temat wpływu nowych preparatów chwastobójczych na zakłócanie stanu mikroflory glebowej i ich biodegradację są niewystarczające.

Przeprowadzone przez Doktorantkę szeroko zakrojone eksperymenty oraz uzyskane wyniki w istotnym stopniu poszerzają wiedzę naukową w tym temacie, a w przyszłości mogą w znaczącym stopniu wpłynąć na udoskonalenie technik stosowanych w rolnictwie

3. Najważniejsze wyniki pracy doktorskiej

Do najważniejszych osiągnięć zaprezentowanych w pracy doktorskiej Pani mgr. Inż. Wiktorii Wilms zaliczam:

- Stwierdzenie, że toksyczność kationów o właściwościach powierzchniowo-czynnych wchodzących w skład HILs obniża wydajność biodegradacji anionów o właściwościach herbicydowych.
- Wykazanie, że obecność takich kationów w HILs, w połączeniu z nietoksycznymi anionami tworzy związki o zwiększonej aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

- Poprzez zastosowanie HILs znakowane izotopem ^{13}C wykazanie, że surfaktanty kationowe i aniony herbicydowe wchodzące w ich skład ulegają odrębnej i odmiennej degradacji w środowisku.
- Wykazanie korzystnego wpływu bioaugmentacji na zwiększoną mineralizację HILs, jak i obniżenie stresu oksydacyjnego w roślinach.
- Wykorzystanie bioaugmentacji do zwiększenia aktywności genetycznej u drobnoustrojów powiązanej ze szlakami biodegradacji wybranych herbicydów.

4. Walory pracy

Podsumowując, praca doktorska mgr inż. Wiktorii Wilms przedstawia nową i przydatną wiedzę odnośnie oddziaływań herbicydowych cieczy jonowych na mikroflorę glebową i rośliny.

Część teoretyczna rozprawy doktorskiej obejmuje duży zakres publikacji z najnowszych lat, w samej pracy zastosowano wiele różnorodnych metod badawczych. Duża część wyników została opublikowana w dobrze punktowanych recenzowanych czasopismach z listy JCR. Pomimo dużej różnorodności otrzymanych wyników doktorantka potrafiła je przedstawić w sposób uporządkowany (wprowadzenie schematów blokowych przed omówieniem kolejnego etapu badań). Eksperymenty zostały gruntownie przeanalizowane, wysunięto krytyczne względem otrzymanych wyników wnioski. Rozprawa doktorska została napisana prawidłowo pod względem redakcyjnym.

5. Uwagi

Po przeczytaniu otrzymanej rozprawy doktorskiej mam kilka uwag.

- Proszę stosować nazwy skrócone drobnoustrojów (dotyczy to zwłaszcza części wynikowej).
- Proszę przed pierwszym użyciem skrótów jak np. 2,4-D, MCPA, podać pełną nazwę związków.

- W pracy doktorskiej zastosowano wiele skrótów. Dlatego uważam, że wyjaśnienie stosowanych skrótów na początku pracy, zamiast na końcu ułatwiło by zaznajomienie się czytelnikowi z treścią.
- Omawiając zastosowane metody spektrometrii mas z użyciem spektrometru QTRAP 4000 zabrakło podania par MRM na podstawie których zaprojektowano metody ilościowe. Jakkolwiek te dane zostały umieszczone w publikacjach doktorantki
- Analizę statystyczną wykonano stosując jednoczynnikową analizę wariancji. W kolejnym etapie można zastosować testy post-hoc, które umożliwiają odpowiedzieć na pytanie, które z analizowanych grup różnią się między sobą.
- Podpisy niektórych rysunków, np. 35-37 są bardzo skrócone, brak opisu zastosowanych skrótów.
- Gleba jest źródłem wielu drobnoustrojów z rodzaju *Bacillus* i *Pseudomonas*, wytwarzających zewnątrzkomórkowe związki powierzchniowo czynne (np. lipopeptydy, ramnolipidy). Te bakterie charakteryzują się dużą opornością wobec biosurfaktantów. Jak można wytłumaczyć obserwowane w pracy doktorskiej różnice w oddziaływaniu HILs wobec przedstawicieli tych rodzajów.
- Biorąc pod uwagę właściwości składników HILs można przypuszczać, że ich miejscem oddziaływania na komórki bakterii jest błona cytoplazmatyczna. W wyniku kontaktu tych związków z błoną zmienia się jej struktura, głównie skład fosfolipidowych kwasów tłuszczowych (PLFAs). Czy na podstawie otrzymanych wyników z analizy kwasów tłuszczowych można stwierdzić, że obecność badanych związków wywiera wpływ na profile fosfolipidowych kwasów tłuszczowych u bakterii?
- Istotnym elementem mikroflory glebowej są grzyby mikroskopowe, czy planowane jest rozszerzenie obecnych doświadczeń o użycie grzybów?

6. Wniosek końcowy

Podsumowując chciałbym zaznaczyć, że badania przeprowadzone przez mgr inż. Wiktorię Wilms przyczyniły się do poszerzenia wiedzy z zakresu właściwości

biologicznych herbicydowych cieczy jonowych i ich oddziaływań na mikroorganizmy glebowe i rośliny. Tematyka rozprawy doktorskiej jest aktualna i ważna. Doktorantka zrealizowała cele postawione w pracy. Oryginalne wyniki zostały poddane poprawnej analizie i wyciągnięto właściwe wnioski. Stwierdzam więc jako recenzent, że praca doktorska mgr inż. Wiktorii Wilms, zatytułowana "Introduction to bioaugmentation with microorganisms capable of degrading herbicides and herbicidal ionic liquids as a factor conducive to herbicide resistance spread" spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. Występuję zatem do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej z wnioskiem o dopuszczenie mgr inż. Wiktorii Wilms do dalszych etapów postępowania o nadanie jej stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.

Ponadto biorąc pod uwagę duży nakład pracy Doktorantki, szeroki i nowatorski warsztat metod i narzędzi badawczych, nowatorstwo wyników badań, sposób ich przedstawienia i interpretacji wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Z poważaniem,

Przemysław Bernat

