

Prof. dr hab. Katarzyna Hrynkiewicz

16.02.2020 Toruń

Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych

Instytut Biologii, Katedra Mikrobiologii

Uniwersytet M. Kopernika w Toruniu

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Justyny Teresy Nykiel-Szymańskiej

p.t. „Eliminacja herbicydów chloroacetanilidowych przez wybrane grzyby strzępkowe z rodzaju *Trichoderma*”

1. Opis ogólny

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Justyny Teresy Nykiel-Szymańskiej została napisana pod kierunkiem dr. hab. Mirosławy Słabej, prof. UŁ, zatrudnionej w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii (Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki).

Rozprawa powstała w oparciu o trzy spójne tematycznie publikacje naukowe wydane w latach 2018-2020 w czasopiśmie: (1) *Pesticide Biochemistry and Physiology* (wydawnictwo Elsevier; IF= 3.44, MNiSW = 100) oraz dwie prace (2) i (3) opublikowane w *Ecotoxicology and Environmental Safety* (wydawnictwo Elsevier; IF= 3.974, MNiSW = 30 i 100). Łączna liczba punktów MNiSW = 230, zaś sumaryczny IF = 11.388. We wszystkich trzech publikacjach doktorantka jest pierwszym autorem, a jej wkład w powstawanie prac określono na odpowiednio 80%, 65% i 60%. Zgodnie z dołączonymi oświadczeniami, doktorantka uczestniczyła w planowaniu koncepcji badań, wykonała eksperymenty przedstawione w pracy, opracowała i zinterpretowała uzyskane wyniki, wykonała analizę statystyczną przedstawionych wyników oraz współuczestniczyła w pisaniu manuskryptów. Wyniki badań zaprezentowanych w powyższych publikacjach powstały z funduszy pochodzących z trzech projektów realizowanych w latach 2016-2018 w ramach „Dotacji celowej na działalność związaną z prowadzeniem badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich”, w których doktorantka była kierownikiem.

2. Cel i układ pracy doktorskiej

Głównym problemem badawczym, który został podjęty przez Doktorantkę jest (1) **możliwość potencjalnego zastosowania kosmopolitycznych grzybów strzępkowych z rodzaju *Trichoderma* w bioremediacji obszarów rolniczych skażonych pozostałościami chloroacetanilidów**. W pracy podjęto się również (2) **oceny wpływu wybranych szczepów *Trichoderma* na wzrost siewek rzepaku poddanych ekspozycji na badane herbicydy chloroacetanilidowe** oraz (3) **zbadano oddziaływania herbicydów na szczepy *Trichoderma* zdolne do biotransformacji chloroacetanilidów oraz analizy zmian adaptacyjnych indukowanych obecnością tych związków**.

Praca doktorska przedstawia wyniki badań podstawowych, jednak z możliwością ich zastosowania w praktyce, co stanowi jej ogromny atut. Wyniki badań zebrane w formie trzech publikacji naukowych poprzedza rozdział, w którym Doktorantka, w formie krótkiego wprowadzenia, opisuje główne zagadnienia i problemy podjęte podczas swojej pracy badawczej, przedstawia główne cele pracy oraz uzyskane wyniki, jak również podejmuje dyskusję, w której porównuje uzyskane przez siebie wyniki z wynikami zaprezentowanymi w innych publikacjach naukowych. Rozdział ten zakończony jest spisem aktualnych źródeł

literaturowych dotyczących danego tematu. Zaplanowane doświadczenia zostały dobrane właściwie i przeprowadzone zgodnie z ogólnie przyjętymi standardami.

3. Znaczenie i aktualność zagadnień zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej

Ciągła potrzeba zwiększania ilości i jakości plonów wymusza na rolnikach stosowanie różnorodnych związków stosowanych w celu ochrony roślin np. pestycydów, z czego największą część stanowią herbicydy. Niestety, tylko niewielka część stosowanego pestycydu trafia do organizmu docelowego (0,1%), natomiast reszta ulega rozproszeniu w środowisku. Zanieczyszczenie środowiska pestycydami stwarza bardzo poważne zagrożenie dla środowiska naturalnego i zdrowia ludzkiego ze względu na wysoką toksyczność względem organizmów żywych. Stąd też badania pozwalające na określenie ich negatywnego wpływu na środowisko, potencjalne zagrożenia wynikające z ich stosowania oraz technologie umożliwiające zredukować ich szkodliwość są niezwykle ważne.

Bioremediacja obszarów rolnych zanieczyszczonych pestycydami stanowi obiecującą i stosunkowo tanią metodę w porównaniu z metodami fizykochemicznymi. Zastosowanie odpowiednio wyselekcjonowanych mikroorganizmów, np. grzybów, stwarza realne szanse na poprawę efektywności tego procesu, a co za tym idzie wzrost zastosowania tej technologii w praktyce. Należy zaznaczyć, że badania nad niezwykle złożonymi mechanizmami występującymi w glebach zanieczyszczonych pestycydami oraz mikroorganizmami przyspieszającymi ich rozkład są niezwykle złożone. Kluczowe jest prawidłowe zaprojektowanie badań oraz zastosowanie kompleksowych analiz mikrobiologicznych. Doktorantka spełniła te wymagania, stąd też praca pozwala na rzetelną i jasną interpretację podjętego problemu, stanowiąc duży potencjał aplikacyjny.

4. Wyniki pracy doktorskiej i ich znaczenie

Wyniki zaprezentowane w pracy doktorskiej dotyczą dwóch związków: alachloru [2-chloro-N-2,6-diethylphenyl-N-(methoxymethyl)acetamid] i metolachloru [2-chloro-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-(2-methoxy-1-methylethyl)acetamid], które należą do grupy herbicydów chloroacetanilidowych, powszechnie stosowanych w rolnictwie ze względu na dużą skuteczność w eliminacji traw, turzyc oraz chwastów liściastych. Mikrobiologiczna degradacja uważana jest za najważniejszą drogę transformacji alachloru i metolachloru w środowisku naturalnym, jednak większość dotychczasowych badań nad tym zagadnieniem

obejmuje wykorzystanie szczepów bakteryjnych np. z rodzaju *Agrobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. oraz *Streptomyces* sp. Doktorantka w swoich badaniach podjęła się określenia możliwości metabolizowania alachloru i metolachloru przez grzyby strzępkowe z rodzaju *Trichoderma* sp. Jest to dobrze znana grupa grzybów wspomagająca wzrost roślin i chroniąca je przed patogenami, zdolna również do degradacji wielu związków chemicznych, np. cyjanków, krezoli, fenoli, aromatycznych amin, a także środków ochrony roślin.

Elementem łączącym wszystkie prace jest analiza ośmiu szczepów grzybów strzępkowych z rodzaju *Trichoderma* pochodzących z różnych lokalizacji geograficznych (Polski, Rosji, Węgier, USA) do eliminacji alachloru i metolachloru.

Podsumowanie najważniejszych osiągnięć:

- Spośród ośmiu szczepów grzybów strzępkowych z rodzaju *Trichoderma* badanych pod kątem biotransformacji alachloru (50 mg/L) i metolachloru (50 mg/L) aż pięć eliminowało około 80-90% początkowego stężenia herbicydu po 72 h, zaś po 168 h inkubacji odnotowano minimalną zawartość alachloru (ok.1%). Wskazuje to na ogromny potencjał tej grupy grzybów do rozkładu badanych herbicydów.
- Zidentyfikowanie po raz pierwszy w hodowli mikroskopowych grzybów strzępkowych dwóch metabolitów metolachloru, będących produktem degradacji tego herbicydu: N-(2-etylo-6-metylofenylo)-2-hydroksy-N-(2-hydroksy-1-metyloetylo)acetamid oraz N-(2-etylo-6-metylofenylo)-N-(2-hydroksy-1-metyloetylo)acetamid.
- Wykazanie stymulacji wzrostu oraz wzrostu poziomu chlorofilu u rzepaku inokulowanego zarodnikami badanych szczepów *Trichoderma* w obecności alachloru i metolachloru oraz skorelowanie tej aktywności grzybów z wytwarzaniem przez nie sideroforów, produkcją deaminazy 1-aminocyklopropano-1-karboksylowej (ACCD) oraz rozpuszczaniem fosforanów.
- Wykazanie w ocenie indukcji stresu oksydacyjnego w hodowlach badanych grzybów mikroskopowych poddanych ekspozycji na alachlor i metolachlor wzrostu poziomu wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (RFT), produktów peroksydacji lipidów (TBARS) oraz białek (grup karbonylowych). Ponadto, wykazanie zmian w profilu fosfolipidowym grzybów w odpowiedzi na toksyczne działanie herbicydów, które wskazują na ich mechanizm adaptacyjny.

5. Wartości dodatkowe

Uzyskane wyniki stanowią ogromny potencjał wiedzy, który w istotny sposób wzbogaca podstawową wiedzę na temat rozkładu herbicydów przez grzyby. Szeroki wachlarz przeprowadzonych badań, nowatorstwo podjętego problemu, jak i publikacja wyników w renomowanych czasopismach naukowych gwarantują autorce wysoką cytowalność powyższych wyników w niedalekiej przyszłości.

W ocenie ogólnego dorobku Doktorantki należy podkreślić, iż jest ona współautorką łącznie siedmiu publikacji o łącznej liczbie punktów MNiSW=345 oraz sumarycznym IF=21.176. Jest współautorką aż 27 prezentacji ustnych oraz 34 posterów zaprezentowanych podczas konferencji naukowych.

6. Uwagi

Nie mam uwag krytycznych do recenzowanej pracy, zaś wymienione poniżej uwagi/pytania mają formę sugestii, które będą stanowiły początek dyskusji podczas obrony pracy doktorskiej:

- Modelem badawczym wybranym w pracy doktorskiej były szczepy wyizolowane z różnych lokalizacji geograficznych (Polski, Rosji, Węgier, USA) i zdeponowane w różnych kolekcjach drobnoustrojów, które charakteryzują się różnymi właściwościami. Czy w przypadku badań Doktorantka wykazała zróżnicowanie badanych szczepów *Trichoderma* w zależności od ich pochodzenia?

- W pracy brak wyjaśnienia, jakimi kryteriami kierowano się wybierając szczepy mikroorganizmów do zaplanowanych doświadczeń.

- Proszę o wyjaśnienie mechanizmów związanych z pozytywnym działaniem sideroforów na wzrost roślin.

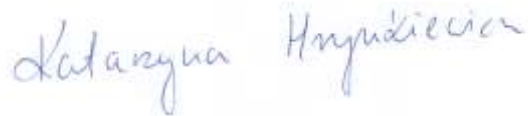
- Doktorantka nie przedstawiła podsumowania dotyczącego dalszego kierunku badań nad podjętym problemem.

7. Wnioski

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Justyny Teresy Nykiel-Szymańskiej przedstawia szeroko zakrojone i doskonale zaprezentowane wyniki badań, które zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, co wpływa na

jej ogólny bardzo wysoki poziom merytoryczny. Liczba moich uwag/sugestii jest niewielka i nie wpływa na ogólną bardzo dobrą ocenę pracy. Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa spełnia bez zastrzeżeń warunki stawiane pracom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie autorki pracy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, zwracam się do Rady Wydziału o wyróżnienie pracy doktorskiej.

A handwritten signature in blue ink, reading "Katarzyna Hrynkiwicz". The signature is written in a cursive, flowing style.

Prof. dr hab. Katarzyna Hrynkiwicz