

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

Toruń 03.08.2022

Podstawa formalna opinii

Opinia została sporządzona dla Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne zgodnie z decyzją podjętą na posiedzeniu w dniu 31 maja 2022 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr Julii Mironenki

p.t. „Badanie aktywności zewnątrzkomórkowych metabolitów *Trichoderma harzianum* jako naturalnych elicytorów, z użyciem technik omicznych”

w postępowaniu dotyczącym nadania stopnia naukowego doktora
w dyscyplinie nauki biologiczne

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 Julii Mironenki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

1. Opis ogólny

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Julii Mironenki została napisana pod kierunkiem dr hab. Przemysława Bernata, prof. UŁ, będącego pracownikiem Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Instytutu Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii Uniwersytetu Łódzkiego.

Badania naukowe zaprezentowane w rozprawie doktorskiej mgr J. Mironenki zostały przygotowane i sfinansowane w ramach Grantu NCN: Opus 10 „Modyfikacje lipidomu mikroskopowych grzybów glebowych w odpowiedzi na wybrane herbicydy” (Nr projektu 2015/19/B/NZ9/00167), którego kierownikiem i opiekunem naukowym jest dr hab. Przemysław Bernat, prof. UŁ.

Struktura pracy jest zgodna z ogólnymi zasadami i wymogami stawianymi rozprawom doktorskim i składa się z trzech spójnych tematycznie prac naukowych opublikowanych w renomowanych i wysoko punktowanych czasopismach naukowych, które ukazały się w latach 2020-2021: (P-1) *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 194, 1-10 (IF₂₀₂₀: 6.291; MNiSW: 100) [<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110383>]; (P-2) *Microbiological Research*, vol.249, 126770 (IF₂₀₂₁: 5.070; MNiSW: 100) [<https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126770>]; (P-3) *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22(23),13058 (IF₂₀₂₁: 6.208; MNiSW: 140) [<https://doi.org/10.3390/ijms222313058>]. Sumaryczny IF powyższych prac wynosi 17,569, natomiast łączna liczba punktów MNiSW 340. We wszystkich tych publikacjach Pani J. Mironenka jest pierwszym autorem, co wskazuje na jej wiodącą rolę w prowadzeniu eksperymentów, analizie danych oraz wyszukiwaniu odpowiedniej literatury i pisaniu manuskryptów.

W rozprawie doktorskiej, poza wymienionymi powyżej pracami naukowymi, autorka zamieściła również informacje dotyczące finansowania badań oraz dorobku naukowego, co pozwala ocenić ogólny rozwój i ukierunkowanie badań naukowych Doktorantki. W pracy zamieszczono dodatkowo takie rozdziały jak: Wprowadzenie, Cele pracy, Metodologię badań, Podsumowanie uzyskanych wyników i stwierdzenia końcowe oraz spis literatury i oświadczenia współautorów. Liczba, znaczenie i aktualność wykorzystanych referencji oraz sposób pisania potwierdzają praktyczną i teoretyczną wiedzę Doktorantki na temat przedstawianego w rozprawie problemu oraz dużą swobodę w opisywaniu tych niejednokrotnie złożonych i trudnych zagadnień. Większość cytowanych danych pochodzi z prac opublikowanych niedawno, w uznanych specjalistycznych czasopismach naukowych.

Głównym celem pracy doktorskiej jest określenie możliwości wykorzystania grzybów z gatunku *Trichoderma harzianum*, jako potencjalnych czynników kontroli biologicznej, chroniących pszenicę przed stresem biotycznym i abiotycznym oraz wspomagających wzrost roślin we wczesnych stadiach kiełkowania. Doktorantka w sposób jasny, w formie czterech punktów przedstawiła cele szczegółowe pracy (str. 12).

Eksperymenty badawcze opisane przez doktorantkę i współautorów w trzech publikacjach prezentują bardzo szeroki wachlarz metod badawczych, które pozwoliły na szczegółową analizę i wyjaśnienie podjętego w pracy doktorskiej problemu naukowego. W rozdziale poświęconym podsumowaniu metodyki badawczej Doktorantka wymienia techniki oraz oprogramowanie zastosowane podczas realizacji pracy doktorskiej, odnosząc się do publikacji (P1-P3), w których zostały one wykorzystane. Metody badawcze zostały dobrane prawidłowo i z zastosowaniem najbardziej zaawansowanych technik i narzędzi badawczych, np. (i) technika rozdziału chromatograficznego materiału sprzężona ze spektrometrią mas

(LC-MS/MS) wykorzystana do analizy ilościowej metabolitów, mykotoksyn, fosfolipidów, oksylipin, glutationu, pigmentów i stężenia herbicydu; (ii) analizy z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej i konfokalnej do oznaczenia uszkodzenia błony komórkowej anionorodników; (iii) pomiar natężenia fluorescencji do oznaczenia przepuszczalności błony komórkowej oraz stężenia wyizolowanych białek; (iv) analiza peptydów na podstawie masy ich ładunków (MALDI-TOF/TOF).

Wyniki badań opisane szczegółowo w 3 publikacjach naukowych zostały podsumowane i częściowo przedyskutowane przez Doktorantkę w formie rozdziałów wprowadzających do zawartych w rozprawie doktorskiej. W polskim opracowaniu pracy nie przedstawiono głównych hipotez i wniosków. W mojej opinii te elementy są ważną częścią podsumowującą wszystkie części składowe prac badawczych doktoranta i ułatwiająca wyznaczenie dalszych etapów pracy naukowej.

2. Znaczenie i aktualność zagadnień zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej

Grzyby z rodzaju *Trichoderma* od wielu lat znajdują praktyczne zastosowanie w ochronie roślin przed patogenami i zwiększaniu ich odporności na stres abiotyczny. Wśród różnych aktywności *Trichoderma* najszerzej badana jest zdolność tego rodzaju grzybów do wytwarzania licznych pozakomórkowych metabolitów, które mogą stymulować wzrost roślin. Należy jednak zauważyć, że na aktywność tę mogą wpływać różne biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe, w tym obecność pestycydów. Wśród nich 2,4-D (kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy), który jest powszechnie stosowany w celu zapobiegania rozwojowi chwastów. Ten syntetyczny, komercyjnie stosowany herbicyd może mieć negatywny wpływ na wzrost powszechnie uprawianych roślin takich jak np. pszenica, ryż i jęczmień, powodując m.in. skręcanie się łodyg i liści, deformację korzeni oraz zahamowanie wzrostu oraz powodować nadprodukcję reaktywnych form tlenu (ROS - od ang. *reactive oxygen species*) i peroksydację lipidów. Do czynników biotycznych, które mogą istotnie wpływać na aktywność i skuteczność działania grzybów *Trichoderma* mogą należeć mykotoksyny (np. niwalenol i zearalenon) wytwarzane przez patogeny z gatunku *Fusarium*.

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 z wykorzystaniem biopreparatów opartych na grzybach z rodzaju *Trichoderma*.

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

Do najważniejszych osiągnięć zaprezentowanych w pracy doktorskiej Pani Julii Mironenki zaliczam:

- (i) Wykazanie, że obecność herbicydu 2,4-D w hodowli płynnej wpływa na rozwój (zaburza syntezę lipidów) i wytwarzanie metabolitów wtórnych *T. harzianum*. W przeprowadzonej części pracy doktorskiej zastosowano łącznie 13 różnych metod, w tym aż 6 technik analitycznych (m.in. chromatografia cieczowa ze sprzężoną spektrometrią mas, mikroskopia fluorescencyjna, metody spektrofotometryczne, metoda jednokierunkowej elektroforezy z identyfikacją białek metodą MALDI-TOF/TOF). (P-1: Mironenka i in., 2020)

- (ii) Wykazanie, że dodanie do podłoża ekstraktów z płynu pochodzącego z *T. harzianum*, w którym zawarte są metabolity wtórne np. kwas harzianowy i T22-azofilon, wpływają na wzrost *Fusarium culmorum* i przyczyniają się do wzrostu stresu oksydacyjnego, który zaburza normalne funkcjonowanie mikroorganizmu. W doświadczeniu wykorzystano dwanaście metod badawczych, w tym 7 technik analitycznych. (P-2: Mironenka i in., 2021)
- (iii) Wykazanie w doświadczeniu przeprowadzonym na kiełkujących nasionach pszenicy (*Triticum aestivum*), że obecność *T. harzianum* stymuluje wzrost roślin i wpływa na obniżenie wskaźników stresu oksydacyjnego wywołanego przez 2,4-D lub *F. culmorum*. W przeprowadzonych doświadczeniach zastosowano dziesięć różnych metod badawczych, łącznie użyto 5 technik. (P-3: Mironenka i in., 2021)

4. Podsumowanie

Podsumowując, praca doktorska mgr Julii Mironenki stanowi zbiór oryginalnych prac przedstawiających nową i przydatną wiedzę z zakresu oddziaływań grzybów *Trichoderma* z patogenami i herbicydami. Eksperymenty, które przeprowadzono przy użyciu zróżnicowanych technik, przedstawiają szeroki i dobrze zaprezentowany zestaw wyników badań, które w publikacjach naukowych (stanowiących część pracy doktorskiej) zostały bardzo dokładnie przeanalizowane i omówione na podstawie dostępnej literatury naukowej. Rozprawa doktorska została poprawnie napisana pod względem redakcyjnym.

5. Uwagi

W przypadku rozprawy doktorskiej składającej się z cyklu opublikowanych prac naukowych recenzent ma ułatwione zadanie, ponieważ zaprezentowane wyniki zostały już wcześniej zrecenzowane przez przynajmniej 2 recenzentów i redaktora. Mam jednak kilka drobnych uwag dotyczących opracowania przygotowanego w języku polskim i publikacji.

Uwagi:

1. W przedstawionym ogólnym dorobku naukowym doktorantka zaprezentowała swój udział w konferencjach naukowych (w latach 2019-2021). Nie wskazała jednak czy udział w tych konferencjach był czynny czy bierny oraz w jakiej formie zaprezentowane zostały wyniki (poster czy wystąpienie). Brakuje również informacji czy były to wydarzenia naukowe międzynarodowe czy krajowe. Samodzielne prezentowanie przez młodych naukowców wyników, zwłaszcza na arenie międzynarodowej, jest niezwykle ważnym elementem ich rozwoju naukowego.
2. W wykazie publikacji (str. 3) Doktorantka podała nieprecyzyjne informacje dotyczące wskaźnika IF wg Journal Citation Reports dla opublikowanych prac naukowych w poszczególnych latach. Są to bardzo niewielkie różnice w punktacji: P-1 (IF₂₀₂₀) powinno być - 6.291, jest 6,23; P-2 (IF₂₀₂₁) powinno być - 5.070, jest - 5,415; P-3 (IF₂₀₂₁) powinno być - 6.208, jest - 5,924. Sumaryczny IF powyższych prac nie zmienił się i wynosi (tak jak podano w pracy) 17,569. Uważam to za bardzo drobne niedociągnięcie.

3. Cele szczegółowe pracy zaprezentowane na str. 12 rozprawy doktorskiej nie zostały powiązane odnośnikami z konkretnymi publikacjami naukowymi, które stanowią część rozprawy doktorskiej.
4. W mojej opinii, czwarty cel pracy: „Oznaczenie możliwości zastosowania ekstraktów z płynu pochodzącego *T. harzianum*, jako potencjalnych preparatów wspomagających wzrost pszenicy w obecności stresu biotycznego i abiotycznego.” nie został w pracy doktorskiej wystarczająco przedyskutowany i podsumowany.
5. Zważywszy na liczbę przeprowadzonych doświadczeń i rangę uzyskanych wyników informacje dotyczące ewentualnego praktycznego zastosowania uzyskanych wyników, jak również dalszego kierunku badań w tym temacie zostały przedstawione zarówno w publikacjach, jak i w polskim opracowaniu pracy zostały zaprezentowane w bardzo ograniczonej formie.
6. Podczas pisania rozprawy doktorskiej nie udało się uniknąć kilku błędów stylistycznych i skrótów myślowych, np. wprowadzenie (str. 11): „praca doktorska dotyczy możliwości wykorzystania grzybów z gatunku *Trichoderma harzianum*, jako potencjalny czynnik”; wprowadzenie do podsumowania wyników uzyskanych w publikacji P-3 (str. 55-56): „...porównanie skuteczność *T. harzianum*”, „Parametr ten został uległ poprawie...”, „jak dodane do pszenicy czynniki stresowe wpływają na ...” .

6. Wnioski

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Julii Mironenki przedstawia szeroko zakrojone i doskonale 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 spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. Wnioskuje do Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Julii Mironenki do dalszych etapów postępowania o nadanie jej stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Jednocześnie, zwracam się do Członków Komisji o **wyróżnienie pracy doktorskiej** za wyróżniającą jakość badań oraz szeroki i nowatorski warsztat metod i narzędzi badawczych wykorzystanych podczas realizacji doświadczeń, które dostarczyły bardzo szczegółowych danych, a w efekcie w sposób istotny pogłębiły wiedzę w zakresie możliwości wykorzystania *T. harzianum* w ochronie roślin przed czynnikami biotycznymi i abiotycznymi.

Prof. dr hab. Katarzyna Hrynkiewicz

