

Prof. dr hab. inż. Marcin Bizukojć

Łódź, 17 lutego 2020 r.

Politechnika Łódzka

Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska

Katedra Inżynierii Bioprocessowej

Recenzja rozprawy doktorskiej

Autor: mgr Justyna Teresa Nykiel-Szymańska

Tytuł: „Eliminacja herbicydów chloroacetanilidowych przez wybrane grzyby strzępkowe z rodzaju *Trichoderma*”

Promotor: dr hab. Mirosława Słaba, prof. UŁ

Podstawą opracowania recenzji jest pismo prof. dr. hab. Andrzeja Kruka Dziekana Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego z dnia 5 lutego 2020 roku z prośbą o przygotowanie oceny rozprawy doktorskiej mgr. Justyny Teresy Nykiel-Szymańskiej zatytułowanej „Eliminacja herbicydów chloroacetanilidowych przez wybrane grzyby strzępkowe z rodzaju *Trichoderma*”. Prośba ta została skierowana na wniosek Komisji UŁ ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne z dnia 4 lutego 2020 roku.

Podstawowe informacje o ocenianej rozprawie doktorskiej

Mgr Justyna Teresa Nykiel-Szymańska przedstawiła rozprawę doktorską zatytułowaną „Eliminacja herbicydów chloroacetanilidowych przez wybrane grzyby strzępkowe z rodzaju *Trichoderma*” w formie cyklu trzech artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie naukowych o zasięgu międzynarodowym, posiadających *Impact Factor*. Te artykuły zostały uzupełnione o wprowadzenie do tematu rozprawy doktorskiej, sformułowanie celów pracy, będących jednocześnie zadaniami badawczymi, syntetyczne omówienie treści przedstawionych publikacji oraz podsumowanie wraz z wnioskami i literaturą cytowaną. Doktorantka przedstawiła także swój pozostały dorobek naukowy, oświadczenia współautorów artykułów naukowych zaliczonych do cyklu oraz źródła finansowania badań. Rozprawa doktorska jest w mojej ocenie w pełni kompletna a jej układ prawidłowy.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

W pierwszej kolejności odniosę się do uzasadnienia wyboru tematu pracy. Nie ma wątpliwości, że wiele zsyntezowanych przez człowieka organicznych związków chemicznych

o szerokich zastosowaniach zarówno w przemyśle chemicznym, spożywczym, kosmetycznym jak i w medycynie jest ksenobiotykami. Również rozwój nowoczesnego rolnictwa, ze względu na rosnącą konsumpcję i wysokie wymagania wydajności plonu z hektara wymaga użycia substancji chemicznych (pestycydów) w celu zwalczania szkodników roślin: owadów, grzybów pasożytniczych czy też chwastów.

Z faktu, że pestycydy są prawie zawsze ksenobiotykami wynika, że ich rozkład biologiczny może być utrudniony, wolniejszy, niepełny, a czasem wręcz niemożliwy, kiedy wprowadzane są one intencjonalnie do środowiska. To właśnie różni pestycydy od innych związków o charakterze ksenobiotyków, które w pewnym sensie przypadkowo są wprowadzane do środowiska po ich wykorzystaniu użyciu na przykład jako substancji leczniczych. Wykorzystywane pestycydy odnajdują się w glebie, w wodzie, kumulują się one w biomacie roślinnej oraz w tkankach zwierząt. Ostatecznie przyswaja je człowiek wraz z wodą i żywnością. Pestycydy mają niepożądany wpływ na zdrowie ludzi w postaci efektu toksyczności ostrej (rzadziej) czy przewlekłej. Co więcej wiele z tego typu substancji podejrzewa się, bądź jest to pewne, że oddziałują one na układ hormonalny zwierząt i ludzi. Są one wtedy tak zwanymi modulatorami hormonalnymi (*endocrine disrupting compounds, EDCs*).

Mgr Justyna Nykiel-Szymańska do swoich badań wybrała herbicydy (substancje chwastobójcze) należące do grupy związków chloroacetanilidowych, a były to dokładnie alachlor oraz metolachlor. Chociaż alachlor nie jest obecnie używany na terenie Unii Europejskiej (metolachlor nadal jest), to i tak te związki są powszechnie stosowane w rolnictwie na innych kontynentach.

Istnieje dobrze ugruntowana wiedza, że grzyby strzępkowe ze względu na swój bogaty metabolizm mają zdolność do transformowania (przede wszystkim utleniania) wielu związków organicznych. Dotyczy to również związków chloroacetanilidowych i Doktorantka postanowiła zbadać zdolność ich biodegradacji/biotransformacji przez grzyby strzępkowe z rodzaju *Trichoderma*. Jeszcze raz należy podkreślić, że herbicydy są intencjonalnie wprowadzane właśnie do środowiska glebowego, żeby zniszczyć chwasty i tam „spotykają się” z mikroflorą glebową, w tym z grzybami strzępkowymi. Stąd też wiedza na temat przemian tych związków jest bardzo ważna.

Uważam, że zarówno we wprowadzeniu do tematu rozprawy doktorskiej, jak i we wprowadzeniach do poszczególnych artykułów należących do cyklu Doktorantka wyraźnie udowodniła potrzebę zbadania procesów biologicznych rządzących rozkładem alachloru i

metolachloru przez grzyby strzępkowe, w tym przypadku na przykładzie grzybów z rodzaju *Trichoderma*.

Rozprawa doktorska obejmuje trzy istotne zagadnienia badawcze, które zostały w sposób jasny i przejrzysty przedstawione w podrozdziale zatytułowanym cele pracy. Należą do nich:

1. Analiza zdolności wybranych szczepów z rodzaju *Trichoderma* do biotransformacji alachloru i metolachloru.
2. Ocena wpływu wybranych szczepów *Trichoderma* na wzrost siewek rzepaku poddanych ekspozycji na badane herbicydy chloroacetanilidowe.
3. Badanie oddziaływania herbicydów na szczepy *Trichoderma* zdolne do biotransformacji chloroacetanilidów oraz analiza zmian adaptacyjnych indukowanych obecnością tych związków.

W mojej opinii te zagadnienia nie są ze sobą bardzo silnie połączone. Mówiąc dokładniej obejmują w pewnym sensie trzy nieco rozdzielne, ale istotne zagadnienia wymagające przeprowadzenia badań naukowych o wspólnym mianowniku, grzyby z rodzaju *Trichoderma* oraz dwa herbicydy chloroacetanilidowe. Nie umniejsza to w żaden sposób, jakości samej rozprawy doktorskiej i prawidłowości wyboru tematu badań.

Cykl publikacji składa się z trzech pozycji. Są to:

- [P1] **Nykiel-Szymańska J.**, Bernat P., Słaba M. (w druku). Biotransformation and detoxification of chloroacetanilide herbicides by *Trichoderma* spp. with plant growth-promoting activities. *Pesticide Biochemistry and Physiology*; 10.1016/j.pestbp.2019.11.018 **IF= 3,44, MNiSW = 100**
- [P2] **Nykiel-Szymańska J.**, Bernat P., Słaba M. **2018**. Potential of *Trichoderma koningii* to eliminate alachlor in the presence of copper ions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 162, 1-9; 10.1016/j.ecoenv.2018.06.060 **IF= 3,974, MNiSW = 30**
- [P3] **Nykiel-Szymańska J.**, Różalska S., Bernat P., Słaba M. **2019**. Assessment of oxidative stress and phospholipids alterations in chloroacetanilides-degrading *Trichoderma* spp.. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 184; 10.1016/j.ecoenv.2019.109629 **IF= 3,974, MNiSW = 100**

Sumaryczny IF tych wszystkich publikacji wynosi 11,388. Tu chciałbym zwrócić uwagę, że punktacja w mojej opinii powinna zostać ujednolicona do nowego systemu. Mam na myśli artykuł z 2018 roku, który ma obecnie 100 punktów. Zatem według mnie suma

punktów MNISW to 300, a nie 230, jak napisała to Doktorantka. Wszystkie artykuły zostały opublikowane w czasopiśmie z IF powyżej 3, a zatem cykl ten jest w mojej opinii bardzo dobry, w wręcz wyróżniający się. Wkład mgr Justyny Nykiel-Szymańskiej w powstanie tych publikacji wynosi od 60 do 85% według oświadczeń współautorów, co oznacza, że odegrała ona kluczową rolę w ich powstaniu. Jest to istotne przy ocenie rozpraw doktorskich składających się z cyklu publikacji i ten udział uważam za wyróżniający się.

Teraz omówię bardziej szczegółowo to, co Doktorantka zaprezentowała, realizując powyżej postawione sobie cele badawcze w poszczególnych artykułach składających się na cykl publikacji przedstawionych jako rozprawa doktorska.

Artykuł [P1] opublikowany w *Pesticide Biochemistry and Physiology* bardzo szeroko obejmuje podstawowe badania ukierunkowane na zdolność różnych gatunków grzybów z rodzaju *Trichoderma* do rozkładu biologicznego alachloru oraz metolachloru. Doktorantka prowadziła badania w skali kolb wstrząsanych wykorzystując aż 8 gatunków grzybów strzępkowych z rodzaju *Trichoderma*. Wybór grzybów był trafny, gdyż większość z nich usuwała alachlor i metolachlor z podłoży hodowlanych na poziomie 80 i 90%. Szybkość usuwania tych herbicydów była zależna od gatunku grzyba strzępkowego oraz samego herbicydu. Samo usunięcie herbicydów z podłoża było właściwie wstępnym badaniem.

Doktorantka również określiła przemiany obu badanych herbicydów. Wykryła 8 metabolitów alachloru oraz 4 metabolity metolachloru, które powstały w wyniku biotransformacji związków początkowych. Skorzystała w tym celu z zaawansowanej techniki chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas. Przejrzysty Fig. S1 zamieszczony w suplemencie do tego artykułu bardzo dobrze podsumowuje to osiągnięcie i potwierdza wiedzę na temat reakcji biotransformacji związków organicznych przez grzyby strzępkowe.

W tym miejscu pojawia się zagadnienie do dyskusji. Biorąc pod uwagę metodykę badań opisaną w artykule, Doktorantka oznaczała stężenia obu herbicydów oraz produktów ich biotransformacji w całości hodowli to znaczy w zhomogenizowanej grzybni wraz z podłożem. Ciekawe byłoby zbadać samo podłoże po odfiltrowaniu grzybni. Wtedy stwierdzić można, czy dany grzyb szybko (wolno) usuwa (nie determinując mechanizmu procesu adsorpcja czy biotransformacja, czy jedno i drugie) herbicyd z podłoża i czy wydziela na zewnątrz (czy też je rozkłada enzymami zewnątrzkomórkowymi) produkty biotransformacji. Jeśli Doktorantka posiada taką analizę odfiltrowanego podłoża w kierunku obecności badanych herbicydów oraz produktów ich rozkładu i na tej podstawie jest w stanie wyciągnąć jakieś wnioski, to poprosiłbym o ich prezentację na obronie.

Doktorantka również próbowała wyjaśnić mechanizmy biotransformacji obydwu herbicydów i wyraźnie udowodniła, że uczestniczą w tym enzymy utleniające, jak charakterystyczna dla wielu grzybów zewnątrzkomórkowa lakaza, a także cytochrom P₄₅₀. Potwierdza to oksydacyjny mechanizm biotransformacji tych związków, na co również wskazuje struktura produktów ich biotransformacji. Te zagadnienia znaczenia lakazy i enzymów utleniających w biotransformacji alachloru przez *Trichoderma konigii* zostało szerzej omówione w artykule P2 opublikowanym w *Ecotoxicology and Environmental Safety*. W mojej opinii Doktorantka udowodniła znaczenie lakazy w degradacji alachloru. Artykuł ten dość szeroko omawia te zagadnienia, skupiając się przede wszystkim na wpływie jonów miedzi (niezbędny kofaktor lakazy) na proces biotransformacji. Również w tym przypadku Doktorantka zwróciła uwagę na wytwarzanie reaktywnych form tlenu, które jako obiekt badań należą do zagadnienia nr 3 rozprawy doktorskiej

Mając podejrzenia, że produkty biotransformacji mogą być bardziej toksyczne niż sam wyjściowy związek, Doktorantka przeprowadziła analizę toksyczności podłoży pochodzących z udziałem organizmów wskaźnikowych *Artemia franciscana* oraz *Daphnia magna*. Wyniki tych badań są jednak niejednoznaczne. Doktorantka zwróciła uwagę na to, że grzyby strzępkowe z rodzaju *Trichoderma* wytwarzają metabolity wtórne: kwas harzianowy, kwas harziafilowy, T2azaphilon, T39butenolid i trichoharzin. Zresztą sama o wykryciu tych metabolitów podczas swoich badań napisała. Mogą one jednak zaciemniać obraz analizy toksykologicznej i rzeczywiście tak się stało. Podłoże bez herbicydu ze szczepami IM QF-10 oraz IM6325 okazało się prawie tak zabójcze dla *A. franciscana* jak czysty roztwór herbicydów (Tabela 3, artykuł [P1]). I tu prosiłbym o przedyskutowanie na obronie następujących kwestii: czy akurat u tych szczepów Doktorantka wykrywała któreś z wyżej wspomnianych metabolitów wtórnych i o ocenienie optymalnego szczepu w świetle następującej tezy: czy grzyb strzępkowy o bogatym metabolizmie wtórnym jest dobrym wyborem do biotransformacji ksenobiotyków, czy lepiej jest stosować szczepy o uboższym metabolizmie wtórnym.

Wnioski, jakie Doktorantka sformułowała na podsumowanie tej części badań, są logiczne i w pełni uzasadnione na podstawie uzyskanych wyników.

Kolejne zagadnienie badawcze było również przedstawione w artykule P1 Doktorantka weryfikowała w nim tezę o pozytywnym wpływie grzybów z rodzaju *Trichoderma* na wzrost roślin w połączeniu z obecnością w środowisku dwóch badanych herbicydów. Jest to bardzo interesujący pomysł badawczy, gdyż może pozwolić na określenie wzajemnych zależności pomiędzy pozytywnym wpływem metabolitów wtórnych

Trichoderma, zdolnością *Trichoderma* do biotransformacji herbicydów i negatywnym wpływem herbicydu na wzrost roślin. Jako czynnik pozytywnie wpływający na wzrost siewek rzepaku Doktorantka, określiła obecność wytwarzania sideroforów oraz produkcji dezaminazy 1-aminocyklopropano-1-karboksylowej. Co więcej badane grzyby mają zdolność rozpuszczenia fosforanów dzięki wytwarzaniu kwasów organicznych.

Doktorantka ostatecznie stwierdziła, że cztery z ośmiu badanych szczepów pozytywnie wpłynęły na wzrost siewek rzepaku z powodu wyżej wspomnianych właściwości. Tu jednak pozostaje pewien niedosyt, który wymaga ustosunkowania się Doktorantki. Aktywność sideroforyczną Doktorantka sprawdziła na podstawie stosunkowo prostej analizy spektrofotometrycznej. Czy ten konkretny związek będący sideroforem nie był widziany na widmach masowych podczas analizy LC-MS? Czy wiemy, jaki to jest związek na podstawie literatury? Proszę o przedyskutowanie tego zagadnienia na obronie.

Wnioski, jakie Doktorantka sformułowała zagadnienia badawczego nr 2 są w mojej opinii spójne i pełni uzasadnione.

Trzecie zagadnienie badawcze sięga nieco głębiej i pozwala się przyjrzeć oddziaływaniu alachloru i metolachloru na wybrane szczepy *Trichoderma* sp. na poziomie wewnątrzkomórkowym. Traktuje o tym artykuł [P3].

Doktorantka zbadala tu przede wszystkim stres oksydacyjny, jaki wywołują badane chloroacetanilidowe herbicydy na osiem szczepów *Trichoderma* sp. Chodziło w tym przypadku o określenie zawartości reaktywnych form tlenu (RFT) w grzybni. Doktorantka dokonała tego poprzez oznaczenie poziomu anionorodników ponadtlenkowych, rodnika hydroksylogowego/nadtlenoazotynu przy użyciu odpowiednich barwników i analizę obrazów mikroskopowych. Dodatkowo Doktorantka zbadala wpływ alachloru i metolachloru na biosyntezę białek i kwasów tłuszczowych w badanych grzybach *Trichoderma* sp., szczególnie zawartość i profil kwasów tłuszczowych, który odzwierciedla kondycję błony komórkowej mikroorganizmu.

Ostatecznie Doktorantka udowodniła, że indukcja stresu oksydacyjnego następuje w wykładniczej fazie wzrostu biomasy (pierwsze 24 godziny hodowli), natomiast grzyby walczą z tym stresem, gdyż odpowiedź antyoksydacyjna pojawia się w 72 godzinie hodowli. Herbicydy zmieniły profil fosfolipidowy grzybów, ale udowodnione zostało, że mechanizm toksyczny herbicydów wobec *Trichoderma* nie jest związany ze zwiększeniem przepuszczalności błony komórkowej wywołanej zmianą profilu lipidowego.

Wnioski sformułowane w trzecim zadaniu badawczym są również według mnie uzasadnione.

Podsumowując tę część recenzji, uważam, że artykuły są oryginalnym monotematycznym cyklem publikacji obejmującym rozwiązanie trzech postawionych w celu rozprawy doktorskiej problemów badawczych. Jest to znaczące osiągnięcie niniejszej rozprawy doktorskiej, ponieważ do tej pory w literaturze naukowej nie było tak obszernych doniesień na temat procesów biologicznego rozkładu herbicydów acetanilidowych. Artykuły są napisane na bardzo wysokim poziomie, tematyka badawcza aktualna. Jeszcze raz podkreślę, że dobrze został sformułowany cel rozprawy doktorskiej, a mgr Justyna Nykiel-Szymańska doszła do konkretnych i jasnych wniosków. Dodatkowo chciałbym zwrócić uwagę na wysoką jakość prowadzonych badań przez Doktorantkę pod względem zastosowanych technik analitycznych. Umiała ona wykorzystać najnowocześniejsze aparaty badawczych jak chromatografy cieczowy sprzężony ze spektrometrem mas czy mikroskop konfokalny. Wykorzystanie nowoczesnych metod eksperymentalnych oceniam bardzo wysoko. Również zwrócę uwagę na staranność obróbki danych eksperymentalnych, a przede wszystkim na statystyczną ocenę uzyskanych wyników.

Ocena formalna rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska jest przygotowana bez zarzutu, na uwagę zwraca bardzo dobry styl pisania w języku polskim, również tłumaczenie angielskie streszczenia pracy jest na bardzo dobrym poziomie.

W streszczeniu pracy znajduje się kilka błędów (pomyłek) językowych jak np. „badanie toksykologiczności” zamiast „toksyczności”. Zdarzały się pojedyncze błędy interpunkcyjne. Chciałbym zwrócić tylko uwagę na Fig. 1 w publikacji [P2]. Jeśliby Doktorantka chciała go pokazać w prezentacji na obronie, dobrze by było użyć zwykłych punktów zamiast słupków dla pokazania stężenia biomasy, gdyż te słupki są nieczytelnie i nie wyglądają dobrze.

Uwagi merytoryczne do rozprawy doktorskiej

Szczegółowych uwag merytorycznych nie mam, sformułowałem za to kilka uwag dyskusyjnych, do których Doktorantka powinna się odnieść na obronie. Znajdują się one w treści oceny merytorycznej pracy i zostały wyróżnione podkreśleniem.

Podsumowanie i ostateczne wnioski

Uwagi o charakterze dyskusyjnym zawarte w niniejszej recenzji nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę niniejszej rozprawy doktorskiej.

Chciałbym tu jeszcze dodać, że dodatkowy dorobek Doktorantki poza cyklem publikacji jest również bardzo dobry (4 publikacje w czasopismach z IF) i kilkadziesiąt komunikatów konferencyjnych. Indeks Hirscha jest równy 3, co uważam za dobry wynik na tym etapie rozwoju kariery naukowej.

Zatem, ostatecznie stwierdzam, że w mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Justyny Teresy Nykiel-Szymańskiej spełnia wymogi określone w stosownych przepisach Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, innych towarzyszących aktach prawnych oraz aktach wykonawczych do tejże ustawy. W związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Justyny Teresy Nykiel-Szymańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie składam wnioski o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej, biorąc pod uwagę:

- bardzo wysoką jakość prowadzonych badań i sposób ich przedstawienia,
- formę przedstawionej rozprawy doktorskiej (3 publikacje w bardzo dobrych czasopismach z *Impact Factor*),
- bardzo dobry dodatkowy (4 publikacje z IF) dorobek naukowy Doktorantki (sumarycznie 7 publikacji dla osoby broniącej doktorat to świetny wynik).

Marcel Bielikowski