

Puławy, dn. 20.05.2022 r.

dr hab. Anna Gałązka, prof. IUNG-PIB

Zakład Mikrobiologii Rolniczej

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Elżbiety Mierzejewskiej

**pt. „Dyniowate i ich metabolity wtórne jako stymulatory biologicznej remediacji
gleby zanieczyszczonej herbicydami z grupy fenoksykwasów”**

Przedłożona do oceny praca doktorska Pani mgr Elżbiety Mierzejewskiej została wykonana w Katedrze UNESCO Ekohydrologii i Ekologii Stosowanej na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem dr hab. Magdaleny Urbaniak (UŁ) oraz prof. Jaco Vangronsvelda (Hasselt University) jako promotorów. Recenzję rozprawy doktorskiej przygotowano na prośbę Pani prof. dr hab. Agnieszki Marczak - Przewodniczący Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne.

1. Uwagi ogólne i znaczenie podjętej tematyki badań

Problematyka omawianej rozprawy doktorskiej dotyczy bardzo aktualnej tematyki zanieczyszczenia gleb herbicydami z grupy fenoksykwasów oraz zastosowania roślin dyniowatych i ich selektywnych metabolitów wtórnych jako stymulatorów w procesie bioremediacji tych związków.

Biologiczny rozkład substancji organicznych jest jednym z najefektywniejszych i najbezpieczniejszych sposobów usuwania ich ze środowiska a zarazem procesem długotrwałym i wieloetapowym. Zagrożenie takim skażeniem widoczne jest szczególnie na glebach poddanych długoletniej i silnej antropopresji. Gleba jest siedliskiem życia różnych organizmów i nie powinna stwarzać zagrożenia dla zdrowia ludzi oraz stanu środowiska (bioróżnorodności). Stąd też wszelkie próby podjęcia badań dotyczących rekultywacji terenów skażonych uważam za bardzo cenne i potrzebne w dzisiejszym świecie. W ten nurt doskonale wpisuje się tematyka pracy doktorskiej mgr Elżbiety Mierzejewskiej.

Udział bakterii w kształtowaniu żyzności i zdrowotności gleby jest powszechnie znany, ponieważ to właśnie mikroorganizmy glebowe odgrywają główną rolę w mineralizacji materii organicznej, udostępnianiu roślinom składników pokarmowych, powstawaniu humusu glebowego, ograniczaniu patogenów i wielu innych. Ponadto niniejsza praca doktorska wpisuje się także w tzw. Europejską Strategię Bioróżnorodności. W powyższym kontekście problematyka ocenianej pracy doktorskiej **ma znaczenie utylitarne i praktyczne** ze względu na możliwości wdrażania osiągniętych wyników badań do praktyki. Recenzowana rozprawa doktorska opiera się zarówno na laboratoryjnych metodach podstawowych jak i metodykach doświadczalnych z udziałem roślin. Warto podkreślić jest również to, że w recenzowanej dysertacji jasno i profesjonalnie przedstawiono wyniki badań będące efektem bardzo rzetelnego poprowadzenia doświadczeń.

Przedstawiona powyżej problematyka pracy dotyczy istotnych i aktualnych zagadnień związanych z ochroną środowiska glebowego, a w oparciu o uzyskane rezultaty **bardzo wysoko** oceniam istotność, trafność i aktualność podjętej tematyki badawczej.

2. Ocena formalna rozprawy doktorskiej

Opiniowana rozprawa doktorska ma postać spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych, zgodnie z Ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. art. 13 (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.), Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U., poz. 261).

W skład rozprawy doktorskiej wchodzi sześć publikacji, z czego pięć stanowi oryginalne prace naukowe (jedna na etapie recenzji) oraz jeden artykuł przeglądowy. Zbiór ten stanowi zwięzłe omówienie rezultatów badań zawartych w następujących publikacjach:

1. Urbaniak M., **Mierzejewska E.**, 2019. *Biological remediation of phenoxy herbicide-contaminated environments*, In: Saldarrianga-Norena H, Murillo-Tovar M.A., Faroog R., Dongre R., Riaz S. (Eds) *Environmental Chemistry and Recent Pollution Control Approaches*. IntechOpen, 81-102, ISBN 978-1-83968-063-2 <https://www.intechopen.com/chapters/68504>

2. **Mierzejewska E.**, Baran A., Urbaniak M., 2019. *Biodegradation Potential and Ecotoxicity Assessment in Soil Extracts Amended with Phenoxy Acid Herbicide (2,4-D) and a Structurally-Similar Plant Secondary Metabolite (Ferulic Acid)*, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 104(2):200-205, <https://doi.org/10.1007/s00128-019-02760-5> (IF 2.151; MoES points = 40)
3. Urbaniak M., **Mierzejewska E.**, Tankiewicz M., 2019. *The stimulating role of syringic acid, a plant secondary metabolite, in the microbial degradation of structurally related herbicide, MCPA*, PeerJ, 7:e6745 <https://doi.org/10.7717/peerj.6745> (IF = 2.984; MoES points = 100)
4. **Mierzejewska E.**, Toloczko W., Urbaniak M., 2022. *The effects of syringic acid on the properties of MCPA-contaminated soil and the growth of two cucurbit species*, International Journal of Phytoremediation, 14, 1–10. <https://doi.org/10.1080/15226514.2021.1932727> (IF 3.212; MoES points = 100)
5. **Mierzejewska E.**, Toloczko W., Urbaniak M., 2022. *Zucchini and its characteristic plant secondary metabolite (syringic acid) enhances the microbial activity of MCPA-contaminated soil*, Applied Soil Ecology, submitted 2022/02/05, manuscript number: APSOIL-D-22-00140 (under review) (IF 4.046; MoES points = 140)
6. **Mierzejewska E.**, Urbaniak M., Zagibajło K., Vangronsveld J., Thijs S., 2022, *The effect of syringic acid and phenoxy herbicide MCPA on soil, rhizosphere and plant endosphere microbiome*. Frontiers in Plant Science, section Plant Symbiotic Interactions submitted 2022/02/23, manuscript number: 882228 (in validation) (IF 5.753; MoES points = 100)

Załączone do dysertacji publikacje zostały poprzedzone opracowaniem zawierającym następującą strukturę: Streszczenie w języku angielskim i polskim, Wykaz publikacji oraz skrótów, Wstęp, Hipotezy, Cele, Metody badawcze, Materiały i metody, Dyskusja, Wnioski, Finansowanie oraz Literatura. W skład dysertacji wchodzi także następujące załączniki: Kopie publikacji, Oświadczenia współautorów oraz Wykaz innych aktywności Doktorantki.

Sumaryczny Impact Factor publikacji stanowiących zbiór artykułów według roku publikacji wynosi **18.146**, zaś liczba punktów wg wykazu MEiN wynosi **480**. Są to zatem bardzo dobre wskaźniki i dowodzą, że oryginalne publikacje twórcze stanowią istotną i bardzo wartościową część rozprawy doktorskiej. Wszystkie prace są współautorskie, a Doktorantka jest pierwszym autorem w czterech z nich. Wkład Kandydatki w ich powstanie wynosił 40-60%. Świadczy to o dojrzałości naukowej Doktorantki oraz potwierdza Jej kluczową rolę na wszystkich etapach powstawania rozprawy. Udział Doktorantki w opracowaniu tych publikacji polegał m.in. na pobieraniu próbek, izolacji DNA, oznaczeniach fizykochemicznych i mikrobiologicznych, opracowaniu statystycznym wyników badań, opracowaniu przeglądu literatury i przygotowaniu manuskryptów. Na

szczególną uwagę zasługuje fakt, że wyniki badań stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej ukazały się drukiem w renomowanych czasopismach, takich jak: *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *PeerJ*, *International Journal of Phytoremediation*, *Applied Soil Ecology*. Doskonałym uzupełnieniem oryginalnych prac twórczych jest publikacja dotycząca przeglądu biologicznych metod rekultywacji gleb skażonych herbicydami fenoksyłowymi. Do dokumentacji zostały dołączone oświadczenia o udziale merytorycznym i procentowym Doktorantki oraz współautorów publikacji. Z oświadczeń wynika, że wkład Doktorantki był istotny, zarówno w wykonaniu części eksperymentalnej, jaki opracowaniu i interpretacji wyników.

3. Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Pierwszy rozdział pracy doktorskiej zatytułowany „Wstęp” to dziewięciostronicowy opis tematyki przedmiotu wprowadzający czytelnika w zakres prowadzonych badań. Doktorantka precyzyjnie przedstawia najważniejsze zagadnienia dotyczące biologicznych metod rekultywacji środowisk skażonych herbicydami fenoksyłowymi oraz udziału mikroorganizmów w tym procesie. Z drobnych uwag prosiłabym o wyjaśnienie w tym miejscu definicji i roli bakterii endofitycznych w środowisku glebowym.

Kolejny rozdział dysertacji to „Hipotezy badawcze”, w którym Doktorantka przedstawia dwie główne i słusznie postawione hipotezy badawcze. Kolejny rozdział dysertacji stanowi jasno postawiony cel pracy. W mojej opinii cel badań oraz hipotezy badawcze zostały poprawnie zaplanowane a w toku realizacji badań Doktoranta uzyskała wyniki dające na nie odpowiedź. Weryfikację hipotezy badawczej oparto na powiązanych logicznie kolejnych etapach badań, adekwatnych do przyjętego celu rozprawy doktorskiej. Kolejny rozdział „Materiały i metody” obejmuje opis materiału badawczego oraz metodyk, które zostały wykorzystane w przedstawionych publikacjach składających się na rozprawę doktorską. Na szczególne podkreślenie zasługuje odpowiedni dobór nowoczesnych metod i technik badawczych, tj. sekwencjonowanie następnej generacji, profilowanie metaboliczne, określenie genów funkcyjnych oraz fizyko-chemiczne analizy próbek glebowych wraz z oceną toksyczności tych gleb.

W rozdziale „Omówienie najważniejszych wyników” Doktorantka opisuje w sposób syntetyczny rezultaty badań przedstawione w poszczególnych publikacjach wchodzących w

skład rozprawy doktorskiej. Rezultaty badań zostały bardzo dobrze uzasadnione i porównane z danymi z literatury. Opis wyników podkreśla spójność poszczególnych publikacji wchodzących w skład rozprawy. Doktorantka szczegółowo omawia najistotniejsze wyniki dotyczące wpływu wtórnych metabolitów roślin dyniowatych na:

- potencjał biodegradacyjny mikroorganizmów w stosunku do herbicydów z grupy fenoksykwasów (PH) wraz z potwierdzeniem obecności genów funkcyjnych odpowiedzialnych za ten proces;
- zmianę różnorodności funkcjonalnej gleby (Biolog® Ecoplate)
- zróżnicowanie strukturalne profilu mikrobiologicznego gleby, ryzosfery i endoryzosfery
- zmniejszenie stężenia PH (kultury płynne i gleba)
- ocenę ekotoksyczności za pomocą biotestów (Phytotoxkit® i Microtox®)
- ocenę parametrów zdrowotności roślin.

Kolejny rozdział rozprawy stanowią „Wnioski”, w którym Doktorantka sformułowała sześć trafnych wniosków odpowiadających na cel badań. Na końcu pracy znajduje się starannie przygotowany spis literatury obejmujący najważniejsze i trafnie dobrane pozycje literaturowe z zakresu przedmiotu badań. Ostatni rozdział rozprawy stanowią kopie opublikowanych prac wchodzących w skład zbioru publikacji oraz oświadczenia promotorów i Doktorantki. Dołączone są także oświadczenia potwierdzające procentowy udział i indywidualny wkład współautorów w powstanie poszczególnych publikacji.

Konkludując ocenę merytoryczną rozprawy doktorskiej stwierdzam, że publikacje składające się na dysertację powstały na podbudowie bardzo dobrej koncepcji badań. Zostały starannie opracowane i dostosowane do wymagań czasopism. Wszystkie badania zostały wykonane poprawnie pod względem metodycznym. Wyniki badań są oryginalne. Zostały one poprawnie opracowane statystycznie i dobrze zilustrowane. Wnoszą nowe wartości do mikrobiologii gleb a tym samym poszerzają wiedzę z dziedziny biologii i bioremediacji. Doktorantka udowodniła, że posiada ogólną wiedzę teoretyczną do właściwej oceny otrzymanych wyników badań. Pani mgr Elżbieta Mierzejewska udowodniła także, że posiada umiejętność syntetycznego opisywania problematyki badawczej zaprezentowanej w zbiorze publikacji, którą zatytułowała „*Dyniowate i ich metabolity wtórne jako stymulatory biologicznej remediacji gleby zanieczyszczonej herbicydami z grupy fenoksykwasów*”.

3.1. Najważniejsze osiągnięcia

Bardzo dobrze zaprojektowane doświadczenia, oryginalna koncepcja badań oraz szeroki wachlarz precyzyjnych i nowoczesnych metod badawczych oraz odpowiednie przygotowanie Doktorantki umożliwiło osiągnięcie wielu cennych i wartościowych wyników.

1. Udowodnienie stymulującego wpływu roślin dyniowatych i ich charakterystycznych metabolitów wtórnych (kwas ferulowy i kwas syringowy) na potencjał biodegradacji gleby oraz zwiększenie potencjału degradacyjnego mikroorganizmów zasiedlający ryzosferę i endoryzosferę tych roślin.
2. Stwierdzenie, że powyższy efekt był jednak zależny zarówno od stężenia zastosowanych fenoksykwasów jak i rodzaju zastosowanych metabolitów wtórnych.
3. Stwierdzenie, że dodatek KS do gleby zanieczyszczonej MCPA wpłynął pozytywnie na aktywność mikroorganizmów glebowych, co wskazuje na wyższy potencjał bioremediacyjnych tych mikroorganizmów.
4. Wykazanie zmian w różnorodności strukturalnej bakterii glebowych, ryzosferowych i endofitów poprzez zastosowanie MCPA jak i KS. Ich dodatek wpływał pozytywnie na obecność poszczególnych grup bakterii w badanym próbkach.
5. Potwierdzenie poprzez zastosowanie analiz chromatograficznych i immunoenzymatycznych stymulującego wpływu kwasu syringowego (SA) na zmniejszenie stężenia kwasu 2-metylo-4-chlorofenoksyoctowego (MCPA) oraz wykazanie w testach toksyczności, że SA ma wyższy potencjał łagodzenia toksycznego działania MCPA do usuwania herbicydów.

4. Wniosek końcowy

Podsumowując prezentowana rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wykazuje szeroką wiedzę teoretyczną Pani mgr Elżbiety Mierzejewskiej. Jednocześnie stanowi **niezwykle kompleksowe i praktyczne opracowanie** dotyczące stymulującego wpływu roślin dyniowatych i ich charakterystycznych metabolitów wtórnych (kwasu ferulowego i kwasu syringowego) na potencjał biodegradacji gleby i bakterii ryzosferowych w stosunku do biodegradacji fenoksykwasów. Doktorantka dowiodła, iż posiada wiedzę w powyższej tematyce, jak

również potrafi zaplanować i właściwie przeprowadzić badania metodyczne związane z powyższą tematyką. Moim zdaniem sformułowany problem badawczy został w pełni osiągnięty. Lektura dysertacji oraz oryginalnych publikacji naukowych wchodzących w jej skład robi bardzo dobre wrażenie. Wykorzystany przez Doktorantkę warsztat naukowo-badawczy jest bardzo szeroki, a uzyskane wyniki umożliwiły osiągnięcie zakładanego na wstępie celu pracy. Praca nie budzi zastrzeżeń pod względem formalnym i merytorycznym. Na uznanie zasługuje bardzo dobrze przemyślany plan badań i dobór odpowiednich metod badawczych, w tym także nowoczesnych metod badawczych z zakresu biologii molekularnej i oceny zróżnicowania metabolicznego gleb.

W świetle powyższej oceny, rozprawa spełnia aktualne wymagania merytoryczne i formalne, które zostały określone w art. 13 Ustawy o Stopniach i Tytule Naukowym z 14 marca 2003 r. (Dz. U. nr 65 poz. 595 wraz z późniejszymi zmianami). Wnoszę więc do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pani mgr Elżbiety Mierzejewskiej do kolejnych etapów postępowania doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na duże walory poznawcze i aplikacyjne otrzymanych wyników badań oraz zwracając szczególną uwagę na aktualność i trafność problematyki badawczej oraz wyróżniający się poziom merytoryczny pracy wykonanej przy zastosowaniu nowoczesnych metod i narzędzi badawczych, wnoszę wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Elżbiety Mierzejewskiej stosowną nagrodą. W mojej ocenie wartość dysertacji podnoszą także wyniki badań opublikowane w renomowanych czasopismach z listy JCR, w których Doktorantka ma znaczący udział i jest pierwszym autorem.



dr hab. Anna Gałązka, prof. IUNG-PIB