



POLITECHNIKA POZNAŃSKA
INSTYTUT TECHNOLOGII I INŻYNIERII CHEMICZNEJ
Berdychowo 4, 60-965 Poznań
tel. 61 665-37-16, fax 61 665 36 49
e-mail: lukasz.chrzanowski@put.poznan.pl
prof. dr hab. inż. Łukasz Chrzanowski
Zakład Chemii Organicznej



Poznań, 27.07.2022

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Julii Mironenka

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

Oceniana praca doktorska została wykonana w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Instytutu Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii Wydziału Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem promotora dr hab. Przemysława Bernata, prof. UŁ.

Podstawa wykonania recenzji

Recenzję wykonałem w oparciu o uchwałę Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne z dnia 31 maja 2022 roku, a także pisma Przewodniczącej w. w. Komisji Prof. dr hab. Agnieszki Marczak, z dnia 31 maja 2022 roku oraz dostarczonego egzemplarza pracy doktorskiej.

Charakterystyka tematyki pracy doktorskiej

Współczesne rolnictwo nie może funkcjonować bez stosowania środków ochrony roślin. Jednym z typowych, często stosowanych herbicydów z grupy syntetycznych auksyn i regulatorów wzrostu jest kwas 2, 4-dichlorofenoksyoctowy zwany potocznie 2,4-D. Historia jego powstania jest ściśle związana z poszukiwaniem przez amerykańskich i angielskich naukowców środków chemicznych, których zastosowanie pozwoliłoby na zniszczenie upraw ziemniaków i ryżu odpowiednio w Niemczech i Japonii. Takie działanie miało się przełożyć na szybsze zakończenie II Wojny Światowej. Przeprowadzone testy nie wykazały jednak działania opracowanego związku na wymienione powyżej rośliny, niemniej był on bardzo selektywny i skuteczny wobec innych roślin uprawnych i chwastów, dlatego w rekordowo szybkim czasie został skomercjalizowany. W sprzedaży pojawił się już w roku 1945, przez co stał się jednym z pierwszych syntetycznych środków ochrony roślin. Co ciekawe, po upływie ponad 70 lat nadal jest powszechnie stosowany. Przykładowo jego zużycie w samych tylko Stanach Zjednoczonych w roku 2019 wyniosło 20 000 ton, a liczba komercyjnych preparatów zawierających w swoim składzie 2,4-D jest szacowana na ponad 1500. Jego wielka popularność wynika z szeregu czynników, takich jak: prosta synteza a przez to niskie koszty produkcji, brak ochrony patentowej, dobre działanie względem chwastów, stosunkowo niska toksyczność.

2,4-D jest również kojarzony z tzw. „Agent Orange”, gdzie występował wspólnie z 2,4,5-T przede wszystkim w postaci estrów n-butylowych, choć również podaje się informacje, że były to estry iso-oktylowe. Preparatem tym spryskano podczas wojny w Wietnamie około 20% lasów aby utrudnić wykorzystanie lasów do skrytego przemieszczania się wojsk Wietkongu. Toksyczne działanie tego preparatu wynikało jednak przede wszystkim z powstającej podczas syntezy 2,4,5-T dioksyny, a nie z obecności samego 2,4-D czy 2,4,5-T.

2,4-D jest mobilny, nie kumuluje się w glebie, a czas połowicznego rozkładu w glebie wynosi dla warunków tlenowych około 15 dni. Oczywiście jest to wartość średnia i może wahać się w szerokim zakresie w zależności od specyfiki konkretnego miejsca. Choć może się wydawać, że 2,4-D z powodu dużej podatności na procesy biodegradacji nie powinien stanowić zagrożenia dla zwierząt i ludzi, to ostatecznie zależy to od zastosowanej formy użytkowej. O ile 2,4-D w postaci kwasu nie jest uważany za toksyczny, o tyle jego estry,

ze względu na zwiększoną hydrofobowość mogą stanowić już poważne zagrożenie. Do chwili obecnej, pomimo wspomnianych powyżej ponad 70 lat stosowania tego herbicydu, nasza wiedza na temat jego wpływu na organizmy żywe jest nadal niepełna.

O ile wcześniejsze badania koncentrowały się na izolacji mikroorganizmów zdolnych do rozkładu tego herbicydu, opisach szlaków metabolicznych, czy badaniach toksyczności, to dopiero pojawienie się technik omicznych pozwala na bardziej świadome spojrzenie na zmiany w funkcjonowaniu komórek na skutek kontaktu z analizowanymi związkami. Jest to szczególnie istotne, gdyż dopiero ta wiedza pozwala na powiązanie końcowego efektu ze zmianami pojawiającymi się na skutek bezpośredniego kontaktu z badanymi związkami.

Ponieważ działanie herbicydów nie ogranicza się tylko na ich widocznym wpływie na rośliny, ale dotyczy także mikroorganizmów, w sposób naturalny pojawia się pytanie czy poprzez mikroorganizmy można wpływać na jakość roślin uprawnych? Od wielu lat naukowcy z różnych ośrodków opisują mikroorganizmy, które promują wzrost roślin, a liczba dostępnych prac jest olbrzymia. Co ciekawe, w swoich badaniach nie uwzględniają herbicydów, które mogą negatywnie wpływać na pożyteczne mikroorganizmy, przez co w znaczący sposób zmniejszają dobroczynne działanie wprowadzanych mikroorganizmów.

Pod tym względem tematyka badawcza podjęta przez Panią mgr Julię Mironenka od samego początku uzupełnia luki w obecnym stanie wiedzy. W pierwszym etapie Doktorantka dokonała oceny wpływu 2,4-D na wzrost i rozwój *Trichoderma harzianum* wraz z identyfikacją istotnych białek. W następnym etapie przeanalizowała wpływ zewnątrzkomórkowych metabolitów wspomnianego powyżej grzyba, na wzrost i rozwój *Fusarium culmorum*, będącego znanym patogenem niszczącym uprawy pszenicy. Zwieńczeniem badań były eksperymenty, które wykazały zwiększone kiełkowanie pszenicy oraz lepszy rozwój korzeni w obecności metabolitów lub zarodników *Trichoderma harzianum*. Wykorzystanie technik omicznych pozwoliło zrozumieć wielopłaszczyznowe oddziaływania pomiędzy herbicydem, komórkami grzyba a wybraną rośliną wnosząc wiele elementów nowości naukowej do obecnego stanu wiedzy.

Formalna ocena pracy doktorskiej

Praca doktorska Pani mgr Julii Mironenka została zrealizowana i przedstawiona jako cykl trzech spójnych tematycznie prac doświadczalnych, z których wszystkie zostały opublikowane na łamach bardzo dobrze rozpoznawalnych czasopism z listy filadelfijskiej:

- Mironenka J., Różalska S., Soboń A., Bernat P., (2020) Lipids, proteins and extracellular metabolites of *Trichoderma harzianum* modifications caused by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid as a plant growth stimulator. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 194, 1-10, IF₂₀₂₀=6,23
- Mironenka J., Różalska S., Soboń A., Bernat P., (2021) *Trichoderma harzianum* metabolites disturb *Fusarium culmorum* metabolism: Metabolomic and proteomic studies. *Microbiological Research*, 249, 126770, IF₂₀₂₁=5,415
- Mironenka J., Różalska S., Bernat P., (2021). Potential of *Trichoderma harzianum* and Its Metabolites to Protect Wheat Seedlings against *Fusarium culmorum* and 2,4-D. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (23), 13058, IF₂₀₂₁=5,542

Wszystkie wymienione czasopisma są bardzo dobrze rozpoznawalne wśród mikrobiologów, biologów czy chemików zajmujących się zagadnieniami środowiskowymi i cieszą się bardzo dobrą opinią. Należy zwrócić uwagę na kluczowy fakt, że we wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem (równocześnie jedynym doktorantem), a to zwyczajowo odpowiada roli osoby wykonującej większość badań laboratoryjnych. Znajduje to pełne potwierdzenie w przedstawionych na stronach 106-108 oświadczeniach współautorów, zgodnie z którymi udział mgr Julii Mironenka wynosi 65%, 70% oraz 75% odpowiednio dla pracy P-1, P-2 i P-3.

Ponieważ realizacja badań z wykorzystaniem nowoczesnych technik jest kosztochłonna, nie dziwi więc fakt, że kluczową rolę w finansowaniu niniejszego doktoratu odgrywał projekt Narodowego Centrum Nauki:

- **Modyfikacje lipidomu mikroskopowych grzybów glebowych w odpowiedzi na wybrane herbicydy, Opus 10, 2015/19/B/NZ9/00167; kierownik - dr hab. Przemysław Bernat, prof. UŁ**

Warto nadmienić, że z formalnego punktu widzenia recenzowany doktorat stanowią trzy opublikowane artykuły, co w jednoznaczny sposób pozwala określić zakres prac zrealizowanych przez Doktorantkę. Liczba artykułów odpowiada średniej liczbie prac włączanych do analogicznych rozpraw doktorskich w międzynarodowym środowisku naukowym i jest ona w 100% adekwatna do specyfiki prowadzonych badań. Pragnę podkreślić, że jest to bardzo dobrze przygotowany doktorat w układzie zbioru publikacji.

Układ pracy jest typowy dla doktoratów bazujących na zestawie opublikowanych prac badawczych. Całość pracy zawarto na 108 stronach. Po stronie tytułowej znajduje się spis treści, a także osobna strona z informacją o finansowaniu zrealizowanych badań w ramach projektu Opus przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki. Na kolejnej stronie wyraźnie określono jakie prace stanowią podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora oraz w jakich czasopismach zostały one opublikowane. Podano również wartość współczynnika oddziaływania (IF) oraz punkty ministerialne (MEiN), a także wskazano autora do korespondencji. Kolejne trzy strony to spis dorobku naukowego, w którym zawierają się dwie publikacje naukowe niewchodzące w skład doktoratu, jedna monografia, 13 doniesień konferencyjnych oraz uczestnictwo w szkoleniu. Następnie Doktorantka przedstawiła dwustronicowe streszczenie w języku polskim i jego odpowiednik w języku angielskim. Kolejnym elementem pracy jest dwustronicowe wprowadzenie do tematyki niniejszego doktoratu.

Na osobnej stronie autorka przedstawiła cele pracy, w ramach których trafnie wyodrębniono cztery zadania badawcze:

- oznaczenie wpływu kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D) na wzrost i syntezę metabolitów wtórnych przez *T. harzianum* w hodowli płynnej,
- określenie wpływu metabolitów zewnątrzkomórkowych *T. harzianum* na wzrost *F. culmorum* i produkcję metabolitów wtórnych w podłożu stałym oraz w hodowli płynnej,
- zbadanie efektu układu zintegrowanego na kiełkowanie nasion pszenicy: wpływ stresu abiotycznego w postaci dodanego herbicydu (2,4-D), stresu biotycznego w postaci dodanego patogenu (*F. culmorum*) oraz potencjalnego elicytora – *T. harzianum*,
- oznaczanie możliwości zastosowania ekstraktów z płynu pochodzącego z *T. harzianum*, jako potencjalnych preparatów wspomagających wzrost pszenicy w obecności stresu biotycznego i abiotycznego.

Na kolejnych dwóch stronach umieszczono spis wykorzystanych podczas realizacji prac badawczych technik analitycznych wraz z oprogramowaniem po czym zawarto syntetyczne omówienie wyników przedstawionych w cyklu publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Ta sekcja składa się z trzystronicowego omówienia pracy P-1, następnie umieszczono wydruk finalnej wersji publikacji, a po niej zamieszczono materiały dodatkowe (**Supplementary Information**) do pracy P-1. W dalszej kolejności, przed pracą P-2 zawarto pięciostronicowe omówienie wyników, następnie umieszczono wydruk publikacji, a po niej umieszczono materiały dodatkowe. Analogicznie przed pracą P-3 zawarto czterostronicowe omówienie, następnie umieszczono wydruk publikacji oraz materiały dodatkowe.

Następnie Doktorantka przedstawiła dwustronicowe podsumowanie oraz na osobnej stronie wskazała potencjalne zastosowanie praktyczne uzyskanych wyników badań. W dalszej części pracy zamieszczono trzystronicowy spis literatury uzupełniającej. Całość pracy zamykają 3 strony oświadczeń dotyczących udziału współautorów w artykułach naukowych stanowiących podstawę postępowania o nadanie stopnia doktora.

Wprowadzenie wraz z omówieniem wyników napisane są poprawnym stylistycznie językiem. Doktorantka nie wprowadza do treści nadmiernej ilości zapożyczonych terminów obcojęzycznych, wykorzystując przede

wszystkim uniwersalne, powszechnie rozpoznawalne słownictwo. Przeglądając bardzo uważnie pracę znalazłem nieistotne uchybienia, które podano poniżej:

- str. 12 „Niniejsza praca doktorska dotyczy możliwości wykorzystania ... jako potencjalny czynnik ...” – jako potencjalnego czynnika
- str. 12 „Niemieckiej kolekcji mikroorganizmów i kultur komórkowych GmbH (DSMZ)” – raczej Niemieckiej Kolekcji Mikroorganizmów i Kultur Komórkowych bez GmbH, Gesellschaft mit beschränkter Haftung to spółka z ograniczoną odpowiedzialnością a więc poprawnie spolszczona nazwa powinna zawierać skrót „sp. z o.o.”
- str. 14 „naładowanej cząsteczki” – raczej cząsteczki obdarzonej ładunkiem
- str. 15 „Po otrzymaniu widm masowych..” – zgodnie ze słownikiem PWN raczej widmo mas, aczkolwiek forma zastosowana przez Doktorantkę jest bardzo często używana przez środowisko naukowe
- str. 18 „... modifications caused by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid as a plant growth stymulator” – raczej stimulator
- str. 34 „dane nie publikowane” – pisownia łączna „niepublikowane”
- str. 34 „... z 24 godziny hodowli ...” – po 24 godzinach hodowli ?
- str. 56 – intensywność światła – jaka jednostka obowiązuje ?
- str. 6 P-2 Table 2 „Extracttreated” - extracted ?

Warto również bardziej zwrócić uwagę na jednolity sposób zapisu symbolu „°C”. Zgodnie z wytycznymi Rady Języka Polskiego powołanej przez Prezydium Polskiej Akademii Nauk uchwałą nr 17/96 z dnia 9 września 1996 r. zalecana jest następująca reguła „zapisu oznaczeń wartości fizycznych i matematycznych: **między wartością liczbową a literowym oznaczeniem miary, czyli skrótem lub skrótowcem, stawiamy spację, natomiast między wartością liczbową a oznaczeniem miary za pomocą symbolu albo połączenia skrótu/skrótowca i symbolu spacji nie stawiamy.** Poprawny zapis to zatem: np. 5 proc., 5 m, 5 s, 20 V, 13 Ω, 7,5 rd, 10,5 rad, 98 Hz oraz 5% (nie: 5 %, choć: 5 proc.), 3‰ (nie: 3 ‰), 10°C (nie: 10 °C ani 10 ° C), 212°F (nie: 212 °F ani 212 ° F), 3' (nie: 3 ´), 35" (nie: 35 ´), 25g (nie: 25 g) itd.”

Ocena merytoryczna pracy doktorskiej

Przystępując do oceny pracy doktorskiej warto zwrócić uwagę na wzorowe rozeznanie Doktorantki w realizowanej tematyce badawczej. Wśród cytowanych prac znajdują się przede wszystkim pozycje pochodzące z ostatnich kilku lat. Dla dokładności, w pierwszej publikacji na 64 pozycje, tylko 8 pozycji zostało opublikowanych przed rokiem 2000. W drugiej publikacji na 80 pozycji tylko 3 prace pochodzą sprzed roku 2000, natomiast w trzeciej pracy, tylko 2 pozycje na 51 pochodzi sprzed roku 2000. Większość prac nie ma nawet 10 lat. Jest to także doskonałym potwierdzeniem faktu, że realizowane badania są nowatorskie i wpisują się w tematykę badawczą realizowaną przez doskonale rozpoznawalne międzynarodowe ośrodki badawcze. Wśród autorów prac bez trudu można odnaleźć prominentne nazwiska liderów tego typu badań na świecie. W tym miejscu pragnę zauważyć, że Doktorantka dokonała umiejętnej selekcji, eliminując prace o wątpliwej wartości naukowej. Studia literaturowe są podstawą do zaplanowania i przeprowadzenia własnych badań w sposób umożliwiający opublikowanie przyszłych wyników w czasopismach cieszących się renomą w kręgach naukowych. Publikacje muszą wnosić elementy nowości naukowej, pozwalać na lepsze i pełniejsze zrozumienie analizowanych zagadnień naukowych oraz pokazywać uniwersalne informacje ważne dla międzynarodowego środowiska naukowego. Aby to osiągnąć, prace powinny opierać się na aktualnym stanie wiedzy w danej tematyce. Muszą w jasny sposób informować czytelnika co wiemy i co jeszcze należy przebadać. Wszystko to jest możliwe do zrealizowania pod warunkiem wnikliwych studiów literaturowych. Z tego zadania Doktorantka wywiązała się wzorowo i jest to widoczne na każdym etapie badań.

Doktorantka w swoich badaniach wykorzystwała nowoczesne techniki, dzięki którym możliwe było przeanalizowanie wpływu 2,4-D na funkcjonowanie *Trichoderma harzianum*. Grzyb ten, a w zasadzie jego metabolity zewnątrzkomórkowe, mogą służyć jako naturalne elicytory względem mikropatogenów roślin uprawnych, takich jak wybrany przez Doktorantkę *Fusarium culmorum* atakujący pszenicę. W chwili obecnej techniki omiczne to najczęściej wykorzystywane nowoczesne narzędzie pozwalające przeanalizować wielopoziomowe zależności. Nie mam żadnych wątpliwości, że przy zastosowaniu tradycyjnych technik

bardzo trudno byłoby otrzymać tak jednoznaczne wyniki. W wielu przypadkach byłoby to wręcz niemożliwe.

Podany w doktoracie cel badań jest czytelny i bardzo dobrze koresponduje z obecnym stanem wiedzy. Całościowo badania charakteryzują się wieloma elementami nowości naukowej. Przede wszystkim jednak wytyczają nowe standardy gdyż pokazują, że niezmiernie istotne jest przeanalizowanie wpływu kluczowych czynników takich jak obecność 2,4-D na mikroorganizmy promujące wzrost i odporność roślin uprawnych. Nie wystarczy tylko opisać pozytywnego wpływu wytypowanego mikroorganizmu na roślinę, gdyż może się okazać, że wykorzystywane w rolnictwie preparaty chemiczne całkowicie wyeliminują opisywany w warunkach laboratoryjnych efekt. Pod tym względem praca Doktorantki, choć nie obejmuje eksperymentów polowych, pokazuje istotną rolę takich analiz i z pewnością będzie pozytywnie odebrana przez wielu naukowców. Zaprezentowane publikacje są całościowo spójne. Nie jest to zbiór przypadkowych eksperymentów, ale zestaw dobrze zaplanowanych badań, które składają się na komplementarną wiedzę uzyskaną przez Doktorantkę i zaprezentowaną w postaci trzech publikacji.

Szczegółowa analiza załączonych prac badawczych wraz z autorskim komentarzem Doktorantki, nasunęła Recenzentowi pewne komentarze, sugestie i pytania:

- strona 15 – „Wykorzystano w P-1, P-2, P-3, wyniki uznano za istotne przy $p < 0,05$.” Analizując wykresy np. w pracy P-1 należy zadać pytanie czy faktycznie we wszystkich badaniach wykorzystywano $p < 0,05$. W zasadzie przyjęte prawdopodobieństwo testowe jest zgodne z wykorzystywanymi przez badaczy procedurami. Jest to jednak narzędzie do bardzo podstawowej kontroli błędów i tylko pośrednio świadczy o wadze dowodów w weryfikowanej hipotezie badawczej. Warto zapoznać się z opinią Charles Seife opublikowaną w Scientific American pod tytułem: „The Mind-Reading Salmon: The True Meaning of Statistical Significance” oraz artykułami stanowiącymi ripostę. Ponieważ zaplanowane przez Doktorantkę badania analizują zmiany, a efektem finalnym jest opis tych zmian, hipoteza badawcza nie jest weryfikowana w stopniu pozwalającym na tak precyzyjne określenie przyjętego prawdopodobieństwa testowego.
- Praca P-1. Większość publikacji koncentruje się na zagadnieniu biodegradacji i wpływu 2,4-D na różne szczepy bakterii, a grzyby analizowane są znacznie rzadziej. Zdaniem Recenzenta – co zostało już wspomniane w niniejszej recenzji, analiza wpływu 2,4-D na mikroorganizm, który ma stanowić czynnik biologiczny wspomagający wzrost rośliny uprawnej i równocześnie zwalczać inny patogenny mikroorganizm, jest kluczowym elementem świadczącym o nowości naukowej. Trochę szkoda, że w pracy nie ma bezpośredniego odniesienia do tego zagadnienia, co z pewnością przyciągnęłoby uwagę czytelników, ale z pewnością praca w dłuższej perspektywie czasowej będzie dobrze cytowana.
- Praca P-1. Bardzo dobry tytuł i bardzo czytelny abstrakt. Właściwie wszystkie metody są doskonale opisane i pozwalają na pełne zaznajomienie się z realizacją badań. Autorzy wykorzystali różne procedury badawcze co przekłada się na komplementarność uzyskanych wyników. Jeżeli chodzi o dyskusje wyników to jest ona wnikliwa, momentami ostrożna ale nie spekulatywna, przez co posiada wszelkie znamiona poprawności naukowej. Na końcu wniosków brakuje kilku zdań podsumowujących i wskazujących dlaczego ta praca ma uniwersalne znaczenie i co nowego wnosi do obecnego stanu wiedzy.
- Praca P-1. Autorzy nie do końca precyzują jaka forma 2,4-D została wykorzystana podczas badań. Można się domyślać, że jest to herbicyd w formie kwasu, jednak najczęściej w zastosowaniach komercyjnych stosuje się sól amonową, rzadziej estry 2,4-D. Niektóre estry wykazują dużą toksyczność i niekoniecznie byłby to dobry wybór do badań porównawczych. Z jednej strony wybór autorów jest zrozumiały, gdyż chcą oni odnosić się do wyjściowego związku w formie kwasu, ale jest to jednak forma praktycznie niestosowana w rolnictwie. Oczywiście ze względu na wartość pK_a herbicydu i pH mediów hodowlanych, mamy do czynienia z anionem 2,4-D, jednak najlepszym rozwiązaniem byłoby przeprowadzenie równoległych badań wykorzystując sól 2,4-D oraz prosty w składzie preparat komercyjny zawierający taką samą sól. Ewentualnie innym ciekawym rozwiązaniem byłoby porównanie 2,4-D do innych herbicydów z tej samej grupy np. MCPA,

Dikamby itp. Zdaniem Recenzenta taka strategia pozwoliłaby na przyciągnięcie uwagi większej liczby potencjalnych czytelników, a zaprezentowane wyniki byłyby materiałem referencyjnym, który porównuje różne związki w jednej pracy.

- Praca P-1. „The stock solutions of 2,4-D were prepared at a concentration of 5 mg/ mL in ethanol.” Czy Doktorantka uwzględniła obecność etanolu podczas interpretowania wyników? Etanol jest typową substancją pomocniczą i zazwyczaj zwiększa działanie herbicydowe substancji aktywnych w preparatach komercyjnych względem roślin. Jak wygląda ta kwestia w odniesieniu do grzybów?
- Praca P-1. Jakie są środowiskowe stężenia 2,4-D w typowych glebach rolniczych? Czy planując badania autorzy uwzględnili analizowany zakres stężeń w taki sposób aby mikroorganizm miał kontakt z 2,4-D w stężeniach odpowiadających rzeczywistości? Bardzo proszę o rozwinięcie tego wątku podczas odpowiedzi na uwagi recenzentów.
- Praca P-1. Autorzy podają: „Auxins such as 2,4-D exhibit lipophilic properties and disturb the spatial organization of the fungal membranes and their functions (Viegas et al., 2005; Bernat et al., 2018b). Because pH of the culture medium was higher than the pKa of 2,4-D (pKa 2.73), the herbicide lost protons and was predominantly in the anionic form which did not adsorb more strongly to organic material than their neutral counterparts (Ramos de Andrade et al., 2014; Onthong et al., 2007).” Ze względu na wspomniane powyżej komercyjne stosowanie soli 2,4-D i dodatkowych substancji pomocniczych, tzw. adiuwantów, rozpuszczalność 2,4-D jest kilka rzędów większa niż rozpuszczalność formy kwasowej – 0,9 g/L. Generalnie 2,4-D jest uważany za herbicyd mobilny i nie ulega adsorpcji w glebie, w przeciwieństwie do np. glifosatu. Z praktycznego punktu widzenia forma kwasowa 2,4-D i jej sorpcja w glebie w zdecydowanej większości przypadków nie mają znaczenia.
- Praca P-2. Bardzo prosty i czytelny tytuł oraz bardzo dobry abstrakt, w którym brakuje jednak podsumowania wraz z określeniem dlaczego te badania mają znaczenie i jaką uniwersalną wiadomość autorzy chcą przekazać czytelnikom. Zdaniem Recenzenta podczas planowania badań warto było wprowadzić 2,4-D i bezpośrednio sprawdzić jaki jest wpływ tego herbicydu na produkcję metabolitów w obecności *Fusarium culmorum*. Tego kroku brakuje, gdyż w pracy P-1 autorzy analizują oddziaływanie 2,4-D na *Trichoderma harzianum*, natomiast w pracy P-3 opisują oddziaływanie 2,4-D na proces stymulacji pszenicy i zwalczanie *Fusarium culmorum*. Z jednej strony można założyć, że ten krok jest zbędny, ale z drugiej strony te wyniki byłyby w tej publikacji bardzo ważne. Z punktu widzenia czytelnika, wartość poznawcza niniejszej publikacji byłaby dużo większa i z pewnością byłyby to widoczne jako duża liczba cytowań.
- Praca P-2. Warto zwrócić uwagę na pewien szczegół, który jest niestety bardzo częstym błędem u zdecydowanej większości współczesnych autorów. Jeżeli podajemy wartości pomiarowe oraz błąd pomiaru, to obie te wartości powinny być podane z tą samą liczbą miejsc po przecinku. Przykładowo proszę zwrócić uwagę na tabelę 1. „Weight of mycelium [g] 0.87±0.025” – Jeżeli waga ma dokładność ±1 mg to zdecydowanie lepiej zapisać wynik jako 870±25 mg, ewentualnie 0.87±0.03 g, jeżeli dokładność wagi wynosi ±10 mg. Analogicznie nie można zapisywać „0.812±0.3” bo taka forma jest z definicji błędna. Ta sama uwaga odnosi się do informacji ze strony 36 - „27,16 ng/ml”, a kilka linijek niżej „25ng/ml”, czy ze strony 6 pracy P-2: „The highest concentration (26.65 ng/mL) in the control culture was detected at 120 h, when the pH was closest to 7. The mycotoxin was the most stable in the medium (Ryu et al., 2003), and subsequently reached the final concentration of 15.8 ng/mL.” Takich błędnych zapisów wartości pomiarowych jest więcej i nie ma sensu wymieniać ich wszystkich. Warto jednak zwrócić uwagę, że w przypadku prac analitycznych takie zapisy generują wiele dodatkowych pytań recenzentów i mogą być powodem odrzucenia manuskryptu, dlatego lepiej unikać takich oczywistych punktów zaczepienia.

- Praca P-2. „The poor water solubility of some *Trichoderma* metabolites (i.e. peptaibols) (Zotti et al., 2020) resulted in smaller differences between the water extract and the ethanol extract.” W tym zdaniu brakuje wyjaśnienia dlaczego autorzy nie spodziewają się różnic pomiędzy tymi dwoma typowymi rozpuszczalnikami. Peptaibole są peptydami, dlatego w ich przypadku nie będzie zbyt dużych różnic, ale w przypadku związków hydrofobowych różnice byłyby istotne. Dlatego też, biorąc pod uwagę wpływ innych, bardziej hydrofobowych związków, w dalszej części autorzy uzasadniają wybór etanolu: „Due to major changes – inhibiting the growth, sporulation and production of ZEN, the extract dissolved in ethanol was selected for further study.”
- Praca P-3. Bardzo dobry tytuł przyciągający uwagę potencjalnego czytelnika. Abstrakt jest również dobry, choć na końcu warto byłoby wskazać w czytelny sposób jaka uniwersalna wiedza wynika z przeprowadzonych badań. Ta praca jest kluczowa dla całego zbioru publikacji. Po raz pierwszy pokazuje wzajemne interakcje pomiędzy dwoma mikroorganizmami, z których jeden jest patogenem, a drugi promuje wzrost analizowanej rośliny. Nowością jest nie tyle wykorzystanie technik omicznych, ale wprowadzenie do układu badawczego herbicydu. Dzięki takiej strategii, zdaniem Recenzenta, ta publikacja wnosi bardzo wiele cennych informacji do obecnego stanu wiedzy, oraz wskazuje nowe kierunki badawcze.
- Praca P-3. Czy autorzy stosowali tzw. germination index ? Ta kwestia nie jest doprecyzowana w opisie.
- Praca P-3. Troszeczkę szkoda, że autorzy nie zaplanowali eksperymentów polowych, gdyż tylko w ten sposób można by zweryfikować czy zaobserwowane i przeanalizowane działanie promujące *Trichoderma* ma charakter długofalowy. W przypadku bioaugmentacji bakteriami np. o zdolności do rozkładu węglowodorów ropopochodnych, efekt ich działania utrzymuje się zazwyczaj około 30 dni, a po tym czasie ekspresja kluczowych białek zanika i konieczne jest ponowne wprowadzenie bakterii. Oczywiście czasami nawet jednorazowa bioaugmentacja działa długofalowo, ale najczęściej obserwuje się krótkofalowe działanie. Czy w przypadku wprowadzenia wytypowanego szczepu *Trichoderma*, ochrona pszenicy będzie skutkować lepszymi zbiorami? Z praktycznego punktu widzenia jest to najważniejsza kwestia i warto byłoby to sprawdzić.
- Prace P-1, P-2 i P-3. Warto podkreślić, że Doktorantka prowadzi dojrzałą dyskusję naukową opierając się wyłącznie na faktach. W żadnym momencie nie spekuluje i nie wykazuje tendencji do nadinterpretowania uzyskanych danych. Liczą się tylko fakty potwierdzone naukowo. Chciałbym w szczególny sposób zasygnalizować ten fakt, gdyż zasługuje on na wyróżnienie.

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską należy wyróżnić bardzo duży wkład własnej pracy Doktorantki. Należy podkreślić, że jest to praca przemyślana, wymagająca umiejętności praktycznych, oraz doskonale zinterpretowana. Jest to również bardzo dobra praca doktorska zrealizowana w formie zbioru publikacji opatrzonej komentarzem autorskim. Pomimo pewnych uwag i sugestii bardzo wysoko oceniam ją pod względem merytorycznym i wnoszę do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o jej wyróżnienie.

Uzasadnienie wyróżnienia

W niniejszej pracy doktorskiej należy w sposób szczególny zwrócić uwagę na następujące kwestie:

- doskonale przygotowanie merytoryczne Doktorantki w zakresie tematyki badawczej i zaangażowanie w prowadzenie eksperymentów, czego dowodem jest pozycja Doktorantki jako pierwszego autora we wszystkich pracach.
- celny wybór celu pracy wraz z późniejszym wykorzystaniem nowoczesnych technik badawczych co przekłada się na wiele elementów nowości naukowej oraz w pewnym zakresie również

nowatorstwa: Nie ma szans aby w wymienionych wyżej czasopismach przyjęto prace, które opierałyby się na starych metodach badawczych i/lub prezentowały powszechnie znane fakty i ogólnie dostępną wiedzę.

- merytoryczna i dojrzała dyskusja naukowa poparta we wzorowy sposób własnymi wynikami badań, czego dowodem jest bardzo dobre przyjęcie opublikowanych prac przez międzynarodowe środowisko naukowe i widoczne cytowanie prac
- komplementarność wszystkich prac wchodzących w zakres doktoratu, dzięki czemu Doktorantka rozwinęła się naukowo i rozwinęła warsztat badawczy. Doktorantka rozumie i płynnie porusza się w problematyce będącej przedmiotem badań. Wykorzystuje specjalistyczne i aktualne źródła informacji, potrafi planować i prowadzić badania naukowe. Posiada zdolność do interpretacji uzyskanych wyników oraz krytycznej analizy. Bez tych elementów prace byłyby niespójne a czasem nawet wewnątrznie sprzeczne.

Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe aspekty, które składają się na bardzo dobrą, nowoczesną pracę doktorską, wnoszącą dużo elementów nowości naukowej do nauk biologicznych, wnioskuje o wyróżnienie recenzowanej pracy.

Wniosek końcowy

Analizując niniejszą pracę doktorską pod kątem aktualności i oryginalności podjętych badań można z całą pewnością stwierdzić, że Autorka z sukcesem odnalazła swoją niszę badawczą, a zrealizowane przez Nią badania będą interesujące dla szeregu naukowców zainteresowanych wykorzystaniem technik omicznych do oceny interakcji pomiędzy mikroorganizmami i herbicydami.

Reasumując, przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską mgr Julii Mironenka pt. **„Badanie aktywności zewnątrzkomórkowych metabolitów *Trichoderma harzianum* jako naturalnych elicytorów, z użyciem technik omicznych”** oceniam bardzo pozytywnie oraz stwierdzam, że spełnia ona wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim procedowanym na podstawie Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. Ponadto, praca stanowi oryginalne rozwiązanie zagadnienia naukowego oraz wykazuje niezbędną ogólną wiedzę teoretyczną Autorki i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej dlatego wnoszę o dopuszczenie mgr Julii Mironenka do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Z poważaniem,



prof. dr hab. inż. Łukasz Chrzanowski