

Prof. dr hab. inż. Ewa Liwarska-Bizukojć
Politechnika Łódzka
Wydział Budownictwa, Architektury i Inżynierii Środowiska
Instytut Inżynierii Środowiska i Instalacji Budowlanych

Łódź, 28.06.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Julii Mironenki

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

Promotor: dr hab. Przemysław Bernat, prof. UŁ

Podstawą opracowania recenzji jest pismo Pani prof. dr hab. Agnieszki Marczak przewodniczącej Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w Dyscyplinie Nauki Biologiczne z dnia 31.05.2022 z prośbą o przygotowanie oceny wspomnianej wyżej pracy doktorskiej zgodnie z uchwałą tejże Komisji Uniwersytetu Łódzkiego z dnia 31.05.2022.

Podstawowe informacje o ocenianej rozprawie doktorskiej

Mgr Julia Mironenka przedstawiła pracę doktorską zatytułowaną „Badanie aktywności zewnątrzkomórkowych metabolitów *Trichoderma harzianum* jako naturalnych elicytorów, z użyciem technik omicznych” w formie cyklu trzech artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, posiadających *Impact Factor* od 5.415 do 6.230.

Doktorantka przedłożyła następujące artykuły naukowe:

Publikacja 1 oznaczona jako **P-1**: 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*, vol. 194, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110383> (IF: 6,230, MNiSW: 100 pkt.);

Publikacja 2 oznaczona jako **P-2**: Mironenka J., Różalska S., Soboń A., Bernat P., 2021. “*Trichoderma harzianum* metabolites disturb *Fusarium culmorum* metabolism: Metabolomic and proteomic studies”. *Microbiological Research*, vol.249, 126770. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126770> (IF: 5,415, MNiSW: 100 pkt.);

Publikacja 3 oznaczona jako P-3: 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, vol. 22(23),13058. <https://doi.org/10.3390/ijms222313058> (IF: 5,924, MNiSW: 140 pkt.);

Wymienione wyżej artykuły naukowe zostały uzupełnione o wprowadzenie do tematu rozprawy doktorskiej, sformułowanie celów pracy, metodologię badań, zwięzłe omówienie wyników przedstawionych w cyklu publikacji, podsumowanie i stwierdzenia końcowe, wskazanie potencjalnych zastosowań praktycznych uzyskanych wyników badań oraz wykaz literatury uzupełniającej. Doktorantka przedstawiła także oświadczenia współautorów artykułów naukowych zaliczonych do cyklu, źródła finansowania badań, swój dorobek naukowy oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Rozprawa doktorska jest w mojej ocenie kompletna, a jej układ oceniam jako prawidłowy.

Udział procentowy mgr Julii Mironenko w przygotowaniu poszczególnych publikacji, stanowiących cykl przedłożony do recenzji jako rozprawa doktorska, był według mnie wysoki i wynosił od 65% do 75%. Doktorantka nie była autorem korespondującym w żadnej z trzech publikacji.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

W pierwszej kolejności odniosę się do celowości podjętego przez Doktorantkę tematu pracy doktorskiej. Uprawy zbóż, a wśród nich pszenicy, narażone są na działanie czynników stresowych abiotycznych i biotycznych. Stres abiotyczny może być wywołany stosowaniem środków chwastobójczych na pola uprawne, a stres biotyczny wynika m.in. z obecności w glebie mikroorganizmów patogennych. Równocześnie istnieją gatunki mikroorganizmów o właściwościach antagonistycznych wobec patogenów roślin. Należy do nich m.in. grzyb strzępkowy *Trichoderma harzianum*, w przypadku którego udokumentowano już wcześniej pozytywny wpływ na kiełkowanie i wzrost niektórych roślin. Dlatego zbadanie możliwości wykorzystania grzybów z gatunku *Trichoderma harzianum* jako potencjalnego czynnika kontroli biologicznej, chroniącego pszenicę przed stresem, uważam za bardzo potrzebne i uzasadnione merytorycznie. W mojej ocenie wybór zarówno tematu badań, jak i obiektu badań jest niezwykle trafny. Podjęcie tego tematu pozwoli zweryfikować przydatność grzybów *Trichoderma harzianum* do ochrony zbóż przed stresem biotycznym, jak i abiotycznym.

Mgr Julia Mironenko postawiła sobie cztery cele badawcze, a mianowicie (1) oznaczenie wpływu kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D) na wzrost i syntezę metabolitów wtórnych przez *T. harzianum* w hodowli płynnej, (2) określenie wpływu metabolitów zewnątrzkomórkowych *T. harzianum* na wzrost *Fusarium culmorum* i produkcję metabolitów wtórnych w podłożu stałym oraz w hodowli płynnej, (3) 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*, a także (4) oznaczenie możliwości zastosowania ekstraktów z płynu pohodowlanego *T. harzianum*, jako potencjalnych preparatów wspomagających wzrost pszenicy w obecności stresu biotycznego i abiotycznego. Cele zostały trafnie sformułowane i odpowiadają wybranemu tematowi pracy.

Pierwszy z wymienionych celów badawczych Doktorantka zrealizowała na początku swojej pracy. Określiła wówczas skutki działania herbicydu 2,4-D na wzrost *T. harzianum* w hodowli płynnej oraz na wytwarzanie przez ten mikroorganizm metabolitów zewnątrzkomórkowych (publikacja P-1). Mgr Julia Mironenka dowiodła, że herbicyd 2,4-D ma wpływ na skład fosfolipidów, będących istotnym składnikiem błon komórkowych grzybów mikroskopowych, jak również na przepuszczalność błon komórkowych *T. harzianum*. Doktorantka odnotowała statystycznie istotne zwiększenie ilości fosfolipidów z grupy fosfatydyloetanolamin i niższe stężenia fosfatydylocholin w fazie wykładniczej wzrostu *T. harzianum* w obecności herbicydu 2,4-D w porównaniu do układu kontrolnego. Wyższy poziom kwasu fosfatydowego w hodowli z dodatkiem 2,4-D niż w układzie kontrolnym może świadczyć o zaburzeniu równowagi wewnętrznej drobnoustrojów. Dalsze badania dotyczące analizy składu białek zewnątrzkomórkowych oraz oksylipin, będących produktami utlenienia kwasów tłuszczowych, wykazały, że 2,4-D indukuje stres oksydacyjny w hodowli płynnej *T. harzianum*. Stosując technikę rozdziału chromatograficznego materiału sprzężoną ze spektrometrią mas (LC-MS/MS) Doktorantka potwierdziła obecność wśród metabolitów zewnątrzkomórkowych związków chemicznych charakterystycznych dla szczepów *T. harzianum*, to jest kwasu harzianowego i t22-azafilonu. Na uwagę i docenienie zasługuje to, że już w pierwszym etapie badań mgr J. Mironenko wykorzystwała trzynaście metod analitycznych, w tym techniki chromatograficzne sprzężone ze spektroskopią mas, mikroskopię fluorescencyjną, elektroforezę z identyfikacją białek, a także zastosowała do opracowania wyników badań metody statystyczne zaimplementowane w programie STATISTICA v.13.3. Świadczy to dobrym warsztacie analityczno-naukowym i

wszechstronnych umiejętnościach Doktorantki, a także o wysokim poziomie ogólnej wiedzy teoretycznej w dyscyplinie nauki biologiczne.

Biorąc pod uwagę, że szczepy *Trichoderma* mogą wykazywać działanie antagonistyczne wobec szczepów *Fusarium* spp., Doktorantka wytypowała *Fusarium culmorum* jako patogen grzybowy do dalszych badań. Badania te koncentrowały się na określeniu wpływu metabolitów *T. harzianum* na wzrost *F. culmorum* w hodowli na podłożu stałym i na podłożu płynnym (publikacja P-2). Doktorantka wykazała, że w przypadku obydwu podłoży dodanie do nich ekstraktu płynu pohodowlanego *T. harzianum* przyczyniało się do zahamowania wzrostu grzybni *F. culmorum*. W hodowli płynnej wzrost grzybni *F. culmorum* był opóźniony, a lagfaza wydłużyła się w stosunku do kontroli. W obydwu typach hodowli (na podłożu stałym i płynnym) mgr J. Mironenka zaobserwowała zmianę w pigmentacji w hodowlach *F. culmorum* prowadzonych z dodatkiem ekstraktu płynu pohodowlanego *T. harzianum* w porównaniu do układów kontrolnych. Doktorantka oznaczyła syntezowane podczas hodowli *F. culmorum* pigmenty naftochinonowe oraz powiązane najprawdopodobniej z ich syntezą stężenia mykotoksyn, a dokładniej stężenie zearalenonu. W hodowlach *F. culmorum* na podłożu stałym lub płynnym zawierającym ekstrakt z płynu pohodowlanego *T. harzianum*, stężenie zearalenonu było o rząd wielkości niższe niż w hodowlach kontrolnych. W tej części badań Doktorantka dowiodła, że metabolity *T. harzianum* hamują wzrost patogenu grzybowego *F. culmorum*, a także przyczyniają się do obniżenia produkcji mykotoksyn. Ponadto, oznaczając w przeprowadzonych hodowlach *F. culmorum* markery stresu oksydacyjnego, Doktorantka wykazała, że obecność metabolitów *T. harzianum* przyczynia się do stresu oksydacyjnego, który zaburza normalne funkcjonowanie *F. culmorum*.

W dalszych badaniach mgr Julia Mironenka wybrała pszenicę jako modelowy organizm roślinny narażony na działanie stresu biotycznego i abiotycznego, i przeprowadziła testy kiełkowania i wczesnego wzrostu tej rośliny w 12 różnych konfiguracjach. Jest to według mnie bardzo szeroki zakres badań, zwłaszcza uwzględniając różnorodność technik analitycznych zastosowanych w tych badaniach przez Doktorantkę. Zarówno zakres prac eksperymentalnych przeprowadzonych przez Kandydatkę, jak i dobór technik analitycznych uważam za właściwy, pozwalający na realizację celów pracy doktorskiej. Świadczy on także o samodzielności naukowej Pani mgr J. Mironenki. Przeprowadzone w tej części pracy testy z udziałem pszenicy pozwoliły ocenić wpływ pestycydu 2,4-D i/lub fitopatogenu *F. culmorum* na kiełkowanie i wczesny wzrost pszenicy, a także ocenić skuteczność działania *T. harzianum* w ochronie pszenicy przed czynnikami stresowymi (publikacja P-3). Mgr J. Mironenka

wykazała, że zarówno metabolity *T. harzianum* obecne w ekstrakcie z płynu pohodowlanego, jak i zarodniki *T. harzianum* przyczyniają się do poprawy wzrostu pszenicy we wczesnych stadiach. Potwierdziła też w testach z udziałem pszenicy, że metabolity *T. harzianum* obniżają stężenie mykotoksyny (zearalenonu) produkowanej przez *F. culmorum*. Doktorantka przeprowadziła dogłębną analizę profilu białkowego korzeni i pędów pszenicy we wszystkich 12 konfiguracjach testów roślinnych. Stwierdziła, że większość oznaczonych białek pochodząca z testów z czynnikami stresowymi była zaangażowana w procesy antyoksydacyjne i odpowiedzi na stres, a białka pochodzące z testów kontrolnych, z zarodnikami *T. harzianum* lub z ekstraktem z płynu pohodowlanego tego grzyba zaangażowane były w metabolizm węglowodanów czy procesy glikolityczne. Porównując skuteczność działania metabolitów *T. harzianum* zawartych w ekstrakcie płynu pohodowlanego vs. działanie zarodników *T. harzianum* Doktorantka stwierdziła, że metabolity w płynie pohodowlanym pozytywnie wpływają na kiełkowanie i wzrost pszenicy w obecności czynników stresowych w początkowych stadiach wzrostu, natomiast dodanie zarodników tego grzyba było skuteczniejsze biorąc pod uwagę cały czas trwania testu.

Podsumowując ocenę merytoryczną pracy doktorskiej mgr Julii Mironenki, uważam, że Doktorantka w pełni zrealizowała postawione na początku badań cele. Posługując się sprawnie wieloma zaawansowanymi technikami analitycznymi oraz analizą statystyczną uzyskanych wyników badań, wykazała, że metabolity *T. harzianum* hamują wzrost patogenu grzybowego *F. culmorum* oraz obniżają produkcję mykotoksyn (zearalenonu), a równocześnie mają pozytywny wpływ na początkowe stadia wzrostu pszenicy. Stanowi to Jej oryginalny wkład w rozwiązanie problemu naukowego. Uwagę zwraca też kompleksowość przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej i dociekliwość Doktorantki w wyjaśnianiu roli *Trichoderma harzianum* jako czynnika kontroli biologicznej wzrostu roślin. Wyniki badań mogą znaleźć potencjalnie praktyczne zastosowanie w ochronie upraw pszenicy przed czynnikami stresowymi.

Ocena formalna pracy

Praca jest dobrze przygotowana pod względem formalnym. Język, którego używa Doktorantka, zwłaszcza w opisie będącym wprowadzeniem do cyklu publikacji, jak i, co oczywiste, w samych publikacjach, charakteryzuje się wysokim poziomem naukowym i ważną w naukach przyrodniczych precyzją. W opisie do cyklu publikacji znalazłam kilka drobnych błędów językowych oraz pewne błędy edycyjne (np. brak rozdziału 11. w spisie treści), które nie mają wpływu na zrozumienie i pozytywną ocenę formalną całej pracy.

Wyniki badań są bardzo dobrze udokumentowane. Każda z trzech publikacji (P-1, P-2 i P-3) wchodzących w skład cyklu opatrzona jest suplementem, który pozwala czytelnikowi lepiej zrozumieć prezentowane w danej pracy wyniki badań i/lub sposób ich uzyskania.

Przygotowując rozprawę doktorską, Kandydatka stosowała właściwe i aktualne źródła literaturowe. Były to prawie wyłącznie artykuły naukowe opublikowane w renomowanych czasopismach posiadających wysoki współczynnik wpływu (*IF*). W każdej z publikacji wchodzących w skład cyklu Doktorantka skorzystała z kilkadziesiątu, a dokładniej było to od 51 do 80, źródeł literaturowych. Oprócz tego, jak już wspomniałam, zamieściła liczący 29 pozycji wykaz literatury uzupełniającej.

Uwagi dyskusyjne do rozprawy doktorskiej

Rozprawę doktorską mgr Julii Mironenki oceniam bardzo wysoko. Chciałabym jednak przedstawić dwie uwagi o charakterze dyskusyjnym, będące równocześnie pytaniami do Doktorantki.

W pracy zaobserwowano, że metabolity *T. harzianum* zawarte w płynie pochodowlanym pozytywnie wpływają na kiełkowanie i wzrost pszenicy w obecności czynników stresowych w początkowych stadiach wzrostu, a dodanie zarodników tego grzyba było skuteczniejsze, biorąc pod uwagę cały czas trwania testu. Testy z udziałem nasion pszenicy trwały 7 dni, co jest często spotykanym czasem trwania hodowli hydroponicznych roślin w warunkach laboratoryjnych. Dlatego chciałabym dopytać, co dokładnie rozumie Doktorantka pod pojęciem wczesnych stadiów wzrostu pszenicy, ile w przybliżeniu dób trwało to wczesne stadium. Co może powodować, że zarodniki *T. harzianum* są skuteczniejsze w ochronie przed czynnikami stresowym od płynu po hodowli tego grzyba?

Drugie pytanie dotyczy zastosowania praktycznego uzyskanych wyników. Czy według Doktorantki w środowisku glebowym skuteczność działania *T. harzianum* w ochronie zbóż przed czynnikami stresowymi będzie podobna jak w hodowlach hydroponicznych?

Prosiłabym, żeby Doktorantka odniosła się na publicznej obronie do tych dwóch uwag dyskusyjnych.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Chciałabym podkreślić, że wymienione powyżej uwagi o charakterze dyskusyjnym nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę niniejszej rozprawy doktorskiej. W mojej opinii całokształt dorobku, a zwłaszcza liczba i jakość publikacji, a także wysoki udział procentowy

Doktorantki podany w oświadczeniach współautorów, spełnia z nawiązką wymagania stawiane pracom doktorskim.

Podsumowując recenzję, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Julii Mironenki spełnia wymogi określone w stosownych przepisach Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. poz. 1668 z późn. zm.). W związku z tym wnioskuję do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w Dyscyplinie Nauki Biologiczne o dopuszczenie Pani mgr Julii Mironenki do dalszych przewidzianych przepisami etapów postępowania doktorskiego.

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

- bardzo wysoką jakość przeprowadzonych badań, ich interdyscyplinarny charakter, wielość zastosowanych nowoczesnych technik analitycznych, co zaowocowało uzyskaniem kompleksowych danych na temat wpływu grzybów na wzrost pszenicy w warunkach stresowych,
- formę przedstawionej rozprawy doktorskiej (3 publikacje w bardzo dobrych czasopismach naukowych z listy JCR posiadających od 100 do 140 pkt. MNiSW, łącznie 340 pkt.).

Edwardo Bizukajć