

Dr hab. Przemysław Bernat, prof. UŁ
Uniwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej
i Biotechnologii UŁ

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr inż. Jana Homa
pt. " Environmental impact of ionic liquids with herbicidal activity"

Podstawa formalna opinii

Opinia została sporządzona dla Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Poznańskiej zgodnie z decyzją podjętą na posiedzeniu w dniu 8 października 2024 r.

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 inż. Jana Homa do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

1. Opis ogólny

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Jana Homa została napisana pod kierunkiem promotora prof. dr hab. inż. Łukasza Chrzanowskiego, będącego pracownikiem Zakładu Chemii Organicznej Instytutu Technologii i Inżynierii Chemicznej Politechniki Poznańskiej oraz promotora prof. dr hab. Pawła Cyplika

z Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Badania naukowe zaprezentowane w rozprawie doktorskiej mgr inż. Jana Homa zostały sfinansowane w ramach Grantu NCN: Opus 15 „Bioaugmentacja bakteriami degradującymi herbicydy jako potencjalny czynnik sprzyjający rozprzestrzenianiu odporności na herbicydy wśród roślin” (Nr projektu 2018/29/B/NZ9/01136), którego kierownikiem był prof. dr hab. inż. Łukasz Chrzanowski

Przedstawiona do oceny praca doktorska została w całości napisana w języku angielskim (poza streszczeniem w języku polskim). Struktura rozprawy ma układ typowy dla prac doktorskich przygotowanych na zasadzie monografii. Obejmuje łącznie 136 stron tekstu, w skład którego wchodzi wykaz źródeł finansowania, streszczenie w języku polskim oraz angielskim, lista stosowanych w rozprawie skrótów, wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki i dyskusja, podsumowanie, literatura, podpisy rysunków, tabele oraz informacje o pozostałej aktywności naukowej doktoranta.

Doktorant we wstępie pracy zaznajamia czytelnika z tematem swoich zainteresowań naukowych. Autor zwraca uwagę na przewidywany wzrost liczby ludności na Ziemi i powiązane z tym zwiększenie zapotrzebowania na żywność. W tym kontekście szczególne znaczenie ma wydajne rolnictwo, które będzie w stanie wyżywić ludzką populację. Kluczową rolę w hodowli roślin uprawnych odgrywa stosowanie herbicydów. Niestety zdecydowana większość wprowadzanych do środowiska substancji czynnych pozostaje w nim oddziałując na organizmy żywe. Doktorant akcentuje także informacje o toksycznym oddziaływaniu adiuwantów, czyli substancji, których rolą jest poprawa skuteczności chwastobójczej herbicydów. Następnie Doktorant podejmuje temat herbicydowych cieczy jonowych (ang. herbicidal ionic liquids, HILs). Autor prezentuje najważniejsze informacje związane z budową HILs oraz zaznajamia czytelnika z ich właściwościami, determinowanymi obecnością anionu o właściwościach herbicydowych i organicznego kationu. Uważa

się, że HILs mogą być alternatywą dla obecnie stosowanych herbicydów. Natomiast biorąc pod uwagę złożoność ich budowy, przed zgodą na ich powszechne użycie wymagane jest poszerzenie naszej wiedzy o ich wpływie na środowisko naturalne, ze szczególnym uwzględnieniem mikrobiomu gleby.

Należy podkreślić, że Wstęp zawiera 7 rysunków ułatwiających zaznajomienie z informacjami związanymi z tematyką rozprawy doktorskiej.

Kolejna część rozprawy została poświęcona prezentacji celów pracy. Doktorant przedstawia cztery główne zamierzenia badawcze dotyczące oznaczenia aktywności biologicznej HILs, ich toksyczności wobec badanych drobnoustrojów, oddziaływaniu cieczy jonowych na aktywność biodegradacyjną drobnoustrojów glebowych oraz określeniu wpływu HILs na obecność genów w środowisku.

Stosowana przez Doktoranta metodyka do realizacji zamierzeń badawczych nie budzi zastrzeżeń. Uważam, że różnorodność użytych metod i technik pozwala uzyskać wiele danych niezbędnych do prawidłowej oceny wyników badań naukowych. Autor prezentuje metody syntezy badanych w pracy cieczy jonowych i następnie charakteryzuje sposoby pracy z materiałem biologicznym. Podane są informacje o badanych bakteriach oraz metodach izolacji i identyfikacji szczepów grzybowych zdolnych do biotransformacji jodosulfuronu metylosodowego. Pan mgr Jan Homa opisuje następnie badania z użyciem kukurydzy, chabra bławatka i HILs. Autor wyjaśnia także metody oznaczania działania fitotoksycznego cieczy jonowych. W kolejnych podrozdziałach Doktorant koncentruje się na prezentacji metod badań toksycznego wpływu HILs na wybrane szczepy bakterii i grzybów jak i ich zdolności do degradacji herbicydowych cieczy jonowych. Podsumowaniem tego działu rozprawy doktorskiej jest opis badań materiału genetycznego mikrobiomu poddanego działaniu HILs.

Kolejne podrozdziały wchodzące w skład rozdziału Wyniki i Dyskusja rozpoczynają się od schematów badawczych zaznajamiających czytelnika z kolejnością poszczególnych eksperymentów wchodzących w skład

poszczególnych etapów części wynikowej. W sumie Autor podzielił ten rozdział na 9 fragmentów.

Doktorant tą część pracy rozpoczyna od charakterystyki stosowanych w pracy herbicydowych cieczy jonowych i prezentuje je w formie graficznej.

Na podstawie otrzymanych wyników wykazano stymulujące działanie badanych HILs opartych o kwasy fenoksyoctowe wobec wzrostu siewek kukurydzy w porównaniu do modelowej mieszaniny herbicydów MCPA i MCPP. Z drugiej strony badane HILs w większości wykazywały bardziej toksyczne oddziaływanie na siewki chabra oraz hodowle szklarniowe.

Poddając analizie próbki gleby skażonej ISM i stosując technikę identyfikacji drobnoustrojów opartą na analizie regionu ITS wykazano obecność izolatów grzybowych.

Kolejnym etapem pracy doktorskiej była ocena toksyczności herbicydowych cieczy jonowych na wzrost wybranych drobnoustrojów. Wykonano badania toksyczności ostrej cieczy jonowych opartych o ISM wobec modelowych gatunków bakterii, *Bacillus subtilis* i *Streptomyces halstedii*. Spośród badanych związków stwierdzono aktywność przeciwdrobnoustrojową dla [C₁₂Chol][ISM]. Natomiast dla cieczy jonowych w których skład wchodzi MCPA i MCPP wykazano, że ich oddziaływanie wobec bakterii Gram-dodatnich jest bardziej toksyczne w stosunku do bakterii Gram-ujemnych. Analogiczną obserwację dokonano dla badań z użyciem HILs zawierających dikambę i wybranych przedstawicieli bakterii glebowych. Doktorant podsumowując tą część pracy zwrócił szczególną uwagę na budowę kationów wchodzących w skład HILs, długość łańcuchów alkilowych i powiązane z tym różnice w ich właściwościach fizycznych.

Następnie Pan magister opisał zdolność badanych bakterii i grzybów do biodegradacji herbicydowych cieczy jonowych zarówno w podłożu płynnym jak i glebie. Autor wykazał, że *B. subtilis* i *Hansschlegelia zihuaiae* S113 były odporne na działanie jodosulfuronu i HILs na bazie jodosulfuronu w stężeniu 100 mg/L oraz, że

jodosuforon ulegał częściowej eliminacji w obecności drobnoustrojów. Biodegradację ISM Doktorant opisał także dla wybranych grzybów w trakcie 14-dniowej hodowli w podłożu płynnym.

Rozwinięciem badań w hodowlach wgłębnych była obserwacja biodegradacji i mineralizacji HILs w glebie. Stwierdzono, że poziom mineralizacji HILs w składzie których wchodzi pochodne fenoksykwasów nie przekracza 20%, natomiast biodegradacja anionów przebiega bardziej intensywnie niż kationów, u których szczególną rolę odgrywa długość łańcucha alkilowego. Dla cieczy jonowych zawierających ISM przygotowano 3-miesięczne doświadczenie, w trakcie którego monitorowano poziom CO₂ wydzielanego przez drobnoustroje glebowe z dodanym szczepem *B. subtilis* 168 w środowisku zanieczyszczonym ISM i HILs. Porównano rezultaty dla układów z naturalnym i bioaugmentowanym mikrobiomem. Stwierdzono, że dodanie *B. subtilis* powoduje w początkowej fazie wzrost ilości wydzielanego CO₂ i podobne wyniki dla biodegradacji HILs. Poszerzeniem tego tematu było badanie wpływu HILs zawierających ISM na skład mikrobiomu gleby i potencjalne jej modyfikacje w wyniku dodania *B. subtilis*. Zidentyfikowano 3 główne typy bakterii Actinobacteriota (Actinobacteria), Proteobacteria i Bacteroidota (Bacteroidetes). Analiza różnorodności biologicznej potwierdziła negatywny wpływ zanieczyszczeń HILs na zmniejszenie różnorodności mikrobioty gleby, co więcej proces bioaugmentacji nie wywarł statystycznie istotnych różnic na skład mikrobiomu.

Doktorant podjął się także analizy mikrobiomu chabra rosnącego w obecności HILs. Spośród badanych bakterii izolowanych z powierzchni i wnętrza korzeni roślin dominowały mikroorganizmy z typu Proteobacteria (ponad 90%). Interesujący była obserwacja bardzo dużego wzrostu klasy Bacilli w wewnętrznej tkance korzenia roślin opornych na HILs. Natomiast na powierzchniach pędów roślin opornych na ISM udział Firmicutes wynosił do 61%, wobec 39% dla Proteobacteria. Analizując skład

endofitów izolowanych z pędów chabra rosnących w obecności HILs stwierdzono, dominację Actinobacteria, zarówno u roślin wrażliwych i opornych na herbicydy.

W ostatnim etapie części eksperymentalnej pracy doktorskiej Pan magister koncentrował się nad analizą genów kodujących wybrane enzymy, których aktywność jest niezbędna do biodegradacji herbicydów na bazie sulfonilomocznika. Badano próbki gleby i tkanek roślin. Stosując metody biologii molekularnej zaobserwowano wyraźną tendencję, że geny te występują częściej w mikrobiomie roślin traktowanych HILs w porównaniu z roślinami kontrolnymi.

Następnie Doktorant podsumował otrzymane wyniki z wyraźnym zaznaczeniem wg Niego najważniejszych wniosków. Literatura, z której korzystał Autor obejmuje 244 pozycje.

Na zakończenie rozprawy doktorskiej umieszczony jest opis aktywności naukowej Doktoranta, który obejmuje wykaz 7 prac naukowych związanych z tematem pracy doktorskiej i opublikowanych w recenzowanych czasopismach z listy filadelfijskiej o IF = 44,456. Natomiast na całkowity dorobek naukowy Doktoranta składa się 9 publikacji o sumarycznym IF= 56,856 oraz 11 doniesień konferencyjnych

2. Znaczenie i aktualność zagadnień zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej

Opłacalność produkcji rolnej w dużej mierze zależy od skutecznej ochrony roślin uprawnych przed chwastami. W tym celu stosowane są herbicydy. Niestety ich powszechność użycia wywiera negatywne skutki na środowisko przyrodnicze. Dlatego poszukuje się alternatywnych sposobów ochrony roślin uprawnych. Za jedną z takich możliwości uważa się zastąpienie klasycznych herbicydów przez herbicydowe ciecze jonowe (HILs), czyli związki będące połączeniem anionu o właściwościach herbicydowych i kationu organicznego. Przed masowym użyciem tych związków wymagane jest nabycie wiedzy o ich możliwym oddziaływaniu na organizmy żywe. Szczególnie należy mieć na uwadze ich wpływ na bakterie i grzyby mikroskopowe. Mikroorganizmy takie są istotną częścią ekosystemów glebowych

i w znaczący sposób oddziałują na zdrowie roślin. Tymczasem, informacje którymi dysponujemy na temat wpływu herbicydowych cieczy jonowych na drobnoustroje glebowe, w tym organizmy żyjące w symbiozie z roślinami i potencjalny wpływ bakterii i grzybów na biodegradację HILs są niewystarczające.

Przeprowadzenie przez Doktoranta wielu różnorodnych doświadczeń zakończonych otrzymaniem interesujących wyników na pewno w znaczący sposób poszerzy wiedzę naukową z zakresu oddziaływania herbicydowych cieczy jonowych na środowisko i przysłuży się odpowiedzi na pytanie o możliwość praktycznego wykorzystania tych substancji w rolnictwie.

3. Najważniejsze wyniki pracy doktorskiej

Do najważniejszych osiągnięć zaprezentowanych w pracy doktorskiej Pana mgr. inż. Jana Homa zaliczam:

- Wykazanie, że chwasty odporne na klasyczne herbicydy są także odporne na HILs.
- Zaobserwowanie, że struktura chemiczna kationów cieczy jonowych, w tym długość łańcuchów alkilowych ma znaczący wpływ na toksyczność HILs w stosunku do badanych przedstawicieli mikroorganizmów i roślin.
- Wykazanie, że biodegradacji podlegają głównie aniony herbicydowe wchodzące w skład HILs.
- Stwierdzenie, że długotrwała obecność herbicydowych cieczy jonowych w środowisku glebowym negatywnie oddziałuje na różnorodność biologiczną mikrobioty gleby.

4. Walory pracy

Podsumowując, praca doktorska mgr inż. Jana Homa prezentuje wiele przydatnych informacji odnośnie oddziaływań herbicydowych cieczy jonowych na mikrobiotę glebową oraz rośliny. Kluczowe jest także porównanie biologicznej aktywności HILS w stosunku do klasycznych herbicydów.

Praca doktorska jest oparta o wyniki otrzymane z użyciem wielu różnorodnych metod badawczych. Duża część wyników została opublikowana w dobrze punktowanych recenzowanych czasopismach z listy JCR. Zapoznanie się czytelnikowi z częścią eksperymentalną pracy znacząco ułatwia wstęp graficzny przygotowany przez Autora dla każdego podrozdziału. Otrzymane wyniki zostały przez doktoranta szczegółowo omówione i przedstawiono krytyczne względem otrzymanych wyników wnioski. Rozprawa doktorska została napisana prawidłowo pod względem redakcyjnym.

5. Uwagi

Po przeczytaniu otrzymanej rozprawy doktorskiej mam kilka uwag.

- Analizę statystyczną w większości doświadczeń uzupełniłbym o testy post-hoc, które umożliwiają odpowiedzieć na pytanie, które z analizowanych grup różnią się między sobą.
- Omawiając zastosowane metody spektrometrii mas z użyciem spektrometru QTRAP 4000 można zaprezentować bardziej dokładnie (zabrakło podania par MRM na podstawie których zaprojektowano metody ilościowe).
- punkt 4.6.2.4- warto także wspomnieć, że wiele szczepów *Aspergillus* spp. jest znanych z produkcji mykotoksyn
- obserwując większą oporność *P. putida* niż *B. cereus* na toksyczny wpływ HILs zawierających MCPA/MCPP należy, tak jak zauważył Pan magister, brać pod uwagę rolę jaką pełnią składniki osłon komórkowych bakterii w mechanizmach oporności. Dodatkowo, wiele szczepów bakterii, przedstawicieli z tych rodzajów jest znanych z produkcji związków powierzchniowo czynnych (np. lipopeptydów, ramnolipidów). Czy w związku z tym Autor pracy zastanawiał się jakie elementy osłon komórkowych bakterii warto poddać analizie pod kątem badań oporności drobnoustrojów?
- W pracy zwracana jest uwaga na wpływ obecności łatwo dostępnego źródła węgla na procesy biotransformacji kationów HILs (np. str. 74) oraz wytwarzanie enzymów

zewnątrzkomórkowych, Czy w związku z tym brane jest pod uwagę oznaczenie w przyszłości aktywności enzymatycznej w glebie skażonej HILs?

- Praca obejmuje dużą różnorodność tematów. Jest to na pewno zaleta rozprawy doktorskiej. Natomiast w niektórych jej fragmentach postarałbym się dokładniej uzasadnić dlaczego w danej części pracy brano pod uwagę tylko jeden model badawczy, np. dlaczego fitotoksyczność cieczy jonowych opartych na bazie jodosulfuronu metylowego badano tylko dla chabra?

6. Wniosek końcowy

Uważam, że badania przeprowadzone przez mgr inż. Jana Homa przyczyniły się do istotnego poszerzenia wiedzy dotyczącej właściwości biologicznych herbicydowych cieczy jonowych i ich oddziaływań na drobnoustroje glebowe oraz rośliny. Doktorant zrealizował założone cele. Na uwagę zasługuje też bardzo obszerny zakres badań. Stwierdzam więc jako recenzent, że praca doktorska mgr inż. Jana Homa, zatytułowana "Environmental impact of ionic liquids with herbicidal activity" spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. Występuję zatem do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Poznańskiej z wnioskiem o dopuszczenie mgr inż. Jana Homa do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.

Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną prezentowanych wyników badań, ich interdyscyplinarny charakter oraz duży nakład pracy Doktoranta związany z zastosowaniem licznych metod i narzędzi badawczych, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Z poważaniem,

Przemysław Bernat

