



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii



Prof. dr hab. Łukasz Drewniak
Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiskowej
Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski
Tel. 5300917671, e-mail: l.drewniak2@uw.edu.pl

Warszawa, dnia 31.01.2025

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Jana Homa

pt. „ Environmental impact of ionic liquids with herbicidal activity”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Jana Homa została wykonana pod kierunkiem promotora prof. dr hab. inż. Łukasza Chrzanowskiego z 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 były realizowane przy wsparciu finansowym z projektu OPUS 15 NCN (DEC-2018/29/B/NZ9/01136), kierowanym przez prof. Łukasza Chrzanowskiego.

Praca doktorska Jana Homa dotyczy badań nad cieczami jonowymi (ILs) zawierającymi aniony herbicydowe jako potencjalnymi pro-środowiskowymi alternatywami dla tradycyjnych herbicydów. Skupiono się na określeniu ich właściwości biologicznych, skuteczności chwastobójczej oraz wpływie na środowisko. W ramach badań zsyntetyzowano i scharakteryzowano ciecze jonowe zawierające takie aniony jak dikamba, MCPP, MCPA i jodosulfuron metylowy, badając wpływ różnych struktur kationowych na toksyczność, biodegradowalność oraz interakcje z organizmami. Wyniki przeprowadzonych prac pokazały wysoką skuteczność herbicydową tych związków wobec roślin podatnych, lecz brak zdolności do przełamania odporności chwastów. Jednocześnie zaobserwowano zwiększoną toksyczność wobec bakterii i ograniczoną biodegradowalność związaną z obecnością hydrofobowych kationów, co budzi obawy dotyczące ich akumulacji w glebie. Analizy molekularne ujawniły

negatywny wpływ ILs na bioróżnorodność mikroorganizmów w glebie i tkankach roślin, wskazując na istotność doboru kationów przy projektowaniu takich związków.

Praca doktorska wpisuje się w aktualne trendy badawcze nad zastosowaniem cieczy jonowych w rolnictwie, wskazując kierunki dla rozwoju bardziej pro-środowiskowych i zrównoważonych herbicydów, minimalizujących negatywne skutki obecnych metod ochrony roślin. Badania nad cieczami jonowymi o działaniu herbicydowym odpowiadają na współczesne wyzwania rolnictwa regeneratywnego, które stawia sobie za cel poprawę biologicznej jakości gleby, zmniejszenie toksyczności stosowanych substancji chemicznych oraz ograniczenie procesu wyjaławiania gleb przez intensywną działalność rolniczą. Propozycja zastosowania pro-środowiskowych i bardziej zrównoważonych herbicydów jest także odpowiedzią na rosnącą potrzebę opracowywania rozwiązań, które wspierają regenerację środowiska naturalnego, a jednocześnie zapewniają wysoką skuteczność w ochronie upraw. Ponadto praca wpisuje się w kontekst wyzwań prawno-administracyjnych, związanych z wdrażaniem polityk krajowych i międzynarodowych, takich jak Europejski Zielony Ład czy strategia „Od pola do stołu”, które dążą do znaczącego ograniczenia stosowania chemicznych środków ochrony roślin. Badania te mogą przyczynić się do opracowania nowych technologii, które będą zgodne z zaostrzającymi się regulacjami dotyczącymi ochrony środowiska i bezpieczeństwa żywności. W tym sensie, rozprawa doktorska stanowi cenne źródło wiedzy nie tylko dla naukowców, ale również dla decydentów, producentów rolnych oraz instytucji odpowiedzialnych za politykę rolną i ochronę środowiska.

Ocena struktury pracy

Dysertacja Jana Homa spełnia wszystkie formalne wymagania akademickie przewidziane dla tego typu dokumentów. Rozprawa została napisana w języku angielskim, co nadaje jej międzynarodowy charakter, a jednocześnie zawiera streszczenie w języku polskim, zgodnie z wymogami formalnymi. Praca została podzielona na logiczne i spójne części, które w pełni odzwierciedlają standardowy układ rozprawy naukowej. Struktura pracy obejmuje następujące elementy: wprowadzenie, cele pracy, materiały i metody, wyniki i dyskusja, podsumowanie i wnioski, lista referencji, tabel, rysunków i skrótów oraz załącznik zawierający dodatkowe informacje uzupełniające badania, takie jak dane z eksperymentów czy spektrogramy. Praca zawiera 131 stron głównej treści, 10 załączników zawierających szczegółowe dane

pomocnicze, w tym spektrogramy, schematy syntetyczne oraz wyniki dodatkowych analiz, 19 tabel, szczegółowo przedstawiających dane eksperymentalne, 35 rysunków, które ilustrują kluczowe wyniki badań. Ponadto, w pracy zawarta jest kompleksowa lista skrótów oraz spis literatury zawierających 188 pozycji, co świadczy o szerokiej analizie literatury przedmiotu.

Dodatkowym elementem pracy jest uwzględnienie informacji o prawach autorskich do artykułów, w których wyniki badań zostały opublikowane. To świadczy o dbałości o zgodność z wymaganiami prawnymi i etycznymi w nauce. Ponadto autor zamieścił rozdział przedstawiający swoje osiągnięcia naukowe z okresu doktoratu, co pozwala na lepszą ocenę zakresu jego aktywności badawczej i wkładu w rozwój dziedziny.

Podsumowując, struktura pracy jest przejrzysta i wzorcowa, a jej układ ułatwia zrozumienie treści oraz prześledzenie toku badań. Warto również podkreślić, że sposób prezentacji celów i wyników wskazuje na zaawansowane umiejętności autora w zakresie komunikacji naukowej.

Ocena merytoryczna

Wprowadzenie do tematu badań zostało bardzo dobrze zaprezentowane. Autor pracy zaprezentował aktualny stan wiedzy dotyczący wyzwań w rolnictwie, ze szczególnym uwzględnieniem stosowania herbicydów i ich wpływu na środowisko. Wprowadzenie obejmuje zarówno historyczne, jak i współczesne aspekty rozwoju rolnictwa oraz znaczenie nowoczesnych technologii w ochronie upraw. Na podstawie licznych badań i danych literaturowych zidentyfikowano kluczowe problemy związane z chemicznymi metodami ochrony roślin, takie jak zjawisko odporności chwastów, toksyczność adiuwantów oraz wyzwania związane z zanieczyszczeniem środowiska. Autor szczegółowo opisuje znaczenie herbicydów, ich mechanizmy działania oraz problemy związane z tradycyjnymi formułacjami. Wprowadzenie wskazuje, że większość komercyjnych mieszanin herbicydowych wymaga dodatku adiuwantów poprawiających skuteczność, lecz jednocześnie przyczyniających się do większej toksyczności dla organizmów nienależących do grupy docelowej. Autor podkreśla, że tylko 1% stosowanych herbicydów dociera do zamierzonego celu, co powoduje akumulację substancji chemicznych w środowisku. Ważnym aspektem, któremu autor poświęca uwagę, jest zastosowanie cieczy jonowych o działaniu herbicydowym, które charakteryzują się niską lotnością, regulowanymi właściwościami fizykochemicznymi (przynajmniej w teorii) oraz

możliwością eliminacji adiuwantów. Omówiony został aktualny stan wiedzy na temat HILs, wskazując na ich potencjalne zalety, takie jak ograniczenie zjawiska dryfu pestycydowego czy zmniejszenie toksyczności dla środowiska. Jednocześnie autor podkreśla, że badania nad tymi związkami są nadal w początkowej fazie, a ich pełny wpływ na środowisko, w tym na mikroorganizmy glebowe i nienależące do celu organizmy, pozostaje nie do końca poznany. Autor jasno łączy wprowadzenie z celami pracy, które koncentrują się na: (i) ocenie aktywności biologicznej HILs wobec chwastów i mikroorganizmów, (ii) analizie toksyczności HILs w zależności od struktury chemicznej, (iii) badaniu ich wpływu na biotransformację herbicydów przez mikroorganizmy, oraz (iv) ocenie oddziaływań HILs na obecność i różnorodność genów mikroorganizmów środowiskowych.

Rozdział *Materiały i metody* w pracy doktorskiej prezentuje szczegółowy i kompleksowy opis zastosowanych technik badawczych, podkreślając różnorodność podejść oraz ich precyzyjne dostosowanie do założonych celów pracy. Autor zapewnia przejrzystość i wysoką jakość opisu, umożliwiając pełną reprodukcję eksperymentów i analiz. Struktura rozdziału jest klarowna i spójna, co ułatwia zrozumienie zastosowanych metod oraz ich powiązania z celami badawczymi. Metodyka została dobrana w sposób kompleksowy i logiczny, w pełni odpowiadając na założone cele badawcze. Użycie zaawansowanych technik chemicznych i biologicznych umożliwiło ocenę aktywności biologicznej, toksyczności oraz wpływu HILs na środowisko. Precyzyjne opisy procedur, w tym szczegóły dotyczące odczynników, parametrów reakcji i warunków eksperymentalnych, świadczą o wysokim poziomie naukowym pracy oraz dbałości o dokładność badań. Rozdział *Materiały i metody* stanowi solidną podstawę dla uzyskanych wyników. Wysoka jakość i różnorodność zastosowanych technik badawczych, wymaga wyróżnienia. Autor stosował między innymi spektroskopię NMR (^1H i ^{13}C) oraz IR do charakterystyki zsyntetyzowanych cieczy jonowych, przeprowadzał testy minimalnego stężenia hamującego (MIC) i minimalnego stężenia bakteriobójczego/grzybobójczego (MBC/MFC), a także testy EC_{50} , umożliwiające ocenę skuteczności i toksyczności dla mikroorganizmów, testy biodegradacji, które pozwoliły na ocenę zdolności mikroorganizmów (bakterii i grzybów) do rozkładu HILs oraz ich wpływu na czas półtrwania badanych związków w środowisku; badania metagenomowe pod kątem analizy wpływu HILs na społeczności mikroorganizmów w glebie i tkankach roślin, czy też badanie obecności i obfitości genów uczestniczących w rozkładzie herbicydów za pomocą technik PCR i qPCR; analizy parametrów

sorpcji w glebie, które uwzględniały wpływ zarówno kationów jak i anionów na dostępność związków dla mikroorganizmów. Wykorzystane metody oraz techniki potwierdzają zasadność podejścia badawczego oraz jego potencjał w generowaniu nowych danych istotnych dla zrozumienia i rozwiązania problemu badawczego. Metodyka pozwala na dogłębną ocenę HILs, uwzględniając ich skuteczność, bezpieczeństwo oraz wpływ na środowisko, co czyni tę pracę wartościowym wkładem w rozwój nauki.

Rozdział wyniki i dyskusja składa się z czterech części, które stanowią spójną całość. Pierwsza część wyników skupia się na syntezie i charakterystyce cieczy jonowych o działaniu herbicydowym (HILs). Celem badań było opracowanie nowych związków chemicznych na bazie dikamby, MCPP, MCPA oraz jodosulfuronu metylowego i określenie ich struktury, czystości oraz właściwości fizykochemicznych. Otrzymano szereg HILs, a poprzez Wykorzystanie metod spektroskopowych, takich jak NMR i IR, potwierdzono ich strukturę chemiczną oraz wysoki stopień czystości. Wyniki pokazały, że poprzez modyfikację długości łańcuchów alkilowych w strukturze kationów możliwe jest kontrolowanie takich parametrów jak rozpuszczalność w wodzie oraz potencjał oddziaływania z roślinami i mikroorganizmami. Modyfikowalna struktura HILs pozwala na ich dostosowanie do specyficznych wymagań aplikacyjnych, co czyni je obiecującą alternatywą dla konwencjonalnych herbicydów. Precyzyjna charakterystyka tych związków stanowi solidną podstawę do oceny ich aktywności biologicznej oraz potencjalnego wpływu na środowisko. Badania opisane w drugim rozdziale miały na celu ocenę skuteczności HILs w zwalczaniu chwastów oraz ich wpływu na wczesny rozwój roślin uprawnych i chwastów odpornych na herbicydy. HILs wykazywały wysoką skuteczność wobec chwastów podatnych, osiągając efektywność porównywalną lub wyższą niż tradycyjne formułacje. Jednakże związki te nie były w stanie przełamać odporności chwastów, co potwierdza hipotezę, że ich mechanizm działania pozostaje zgodny z konwencjonalnymi herbicydami. Dodatkowo, wpływ HILs na rozwój roślin uprawnych był zróżnicowany i zależał od rodzaju kationu, wskazując na potencjalną możliwość ich aplikacji w sposób selektywny. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że HILs mogą być skutecznym narzędziem w zarządzaniu chwastami, ale ich zastosowanie wymaga dokładnego dostosowania do specyfiki upraw i środowiska, szczególnie w kontekście odporności chwastów. Celem kolejnego etapu było zbadanie toksyczności HILs dla mikroorganizmów glebowych oraz ich zdolności do biodegradacji przez bakterie i grzyby. Wyniki wskazują, że HILs o długich łańcuchach

alkilowych wykazywały zwiększoną toksyczność wobec bakterii i grzybów. Biodegradacja była znacznie spowolniona w przypadku związków o wyższej hydrofobowości, co wskazuje, że kationy mają kluczowy wpływ na ich trwałość w środowisku. Ciekawym odkryciem było to, że kationy pochodzenia naturalnego, choć mniej toksyczne, również charakteryzowały się niską podatnością na degradację. Główne wnioski z tej części badań odnoszą się do struktury kationów w HILs, która ma decydujący wpływ na toksyczność i biodegradowalność tych związków, co podkreśla konieczność starannego projektowania ich struktury w kontekście minimalizacji ich wpływu na mikrobiom glebowy. Ostatnia część badań skupiała się na ocenie wpływu HILs na różnorodność mikroorganizmów glebowych oraz ich zdolność do rozkładu herbicydów na poziomie genetycznym. HILs powodowały znaczną redukcję różnorodności mikroorganizmów w glebie, szczególnie w przypadku związków o wyższej toksyczności. Sekwencjonowanie NGS ujawniło zmiany w składzie mikrobiomu, wskazując na przewagę gatunków odpornych na stres środowiskowy. Analiza genów rozkładu herbicydów wykazała, że długotrwały kontakt z HILs prowadził do zwiększenia obecności genów odpowiedzialnych za degradację herbicydów, co może sugerować potencjalne ryzyko adaptacji mikroorganizmów do tych związków. Wnioski z tej części pracy odnoszą się do potrzeby dalszych badań nad długoterminowymi konsekwencjami środowiskowymi w stosunku do mikrobiota gleby. Optymalizacja struktury kationów może pozwolić na minimalizację negatywnych skutków dla środowiska. Wnioski są logicznie wyprowadzone z przedstawionych wyników. W szczególności: (i) wyniki badań nad skutecznością herbicydową HILs zostały powiązane z ich potencjałem zastosowania w praktyce, jednak podkreślono brak nowych mechanizmów działania, co ogranicza ich skuteczność wobec chwastów odpornych; (ii) analizy toksyczności i biodegradowalności pozwoliły na formułowanie wniosków dotyczących wpływu struktury kationów na środowisko, co było jednym z kluczowych obszarów badawczych; (iii) wyniki dotyczące mikrobiomu glebowego i jego reakcji na HILs znalazły bezpośrednie odzwierciedlenie w dyskusji nad koniecznością dalszych badań nad długoterminowymi skutkami ich stosowania. Podsumowanie i wnioski końcowe są nie tylko spójne z tytułem, celami i wynikami pracy, ale również w sposób kompleksowy uwzględniają najważniejsze obserwacje wynikające z badań. Podkreślają zarówno potencjał HILs jako narzędzi wspierających zrównoważone rolnictwo, jak i ich obecne ograniczenia środowiskowe. Całość świadczy o dokładnym zrozumieniu przez autora problematyki badawczej i umiejętności wyciągania trafnych oraz praktycznie istotnych wniosków.

Pytania:

1. Jakie kryteria były brane pod uwagę przy doborze kationów do syntezy badanych HILs? Czy istnieją struktury kationowe, które mogłyby zminimalizować toksyczność bez utraty skuteczności wnikania herbicydu do tkanek roślinnych?
2. Dlaczego do badania minimalnego stężenia hamującego (MIC) oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) pochodnych MCPP/MCPA wykorzystano szczepy *Escherichia coli* i *Pseudomonas putida*, zaś do pochodnych ISM wykorzystano szczepy *Hanslegiella zhihuiae* S113 (DSM 18984), *Streptomyces griseolus* (ATCC 11796), i *Bacillus subtilis* 168 (DSM 23778)? Jakie szczepy *E. coli* i *P. putida* wykorzystano do tych badań – czy to były izolaty środowiskowe z gleby czy szczepy z kolekcji kultur? Z kolei, dlaczego do badania EC50 wykorzystano tylko szczepy *P. putida*, *E. coli* i *B. subtilis* 168 DSM 23778. Uprzejmie proszę o komentarz uzasadniający wybór tych konkretnych szczepów.
3. Czy gleba wykorzystywana do izolacji grzybów była badana pod kątem zawartości herbicydów i czy obecność pozostałości herbicydów i pochodzenie gleby mogło mieć znaczenie w prowadzonych badaniach potencjału biodegradacji herbicydów?
4. Dlaczego chaber bławatek (*Centaurea cyanus*) został wybrany jako modelowy chwast do badania efektu toksycznego wybranych cieczy jonowych? Uprzejmie proszę o komentarz uzasadniający wybór tego organizmu modelowego w kontekście wrażliwości na zanieczyszczenia, aspektów ekologicznych oraz innych organizmów standardowo wykorzystywanych w badaniach?
5. Czy według autora pracy zaobserwowane zmiany w mikrobiomie roślin traktowanych HILs mogą być odwracalne po dłuższym czasie od zakończenia ekspozycji? Jakie długoterminowe konsekwencje mogą wynikać z tych zmian i w jaki sposób należy je zbadać?
6. Jakie dodatkowe modyfikacje chemiczne HILs mogłyby przyczynić się do przełamania odporności chwastów?
7. Czy istnieje ryzyko bioakumulacji HILs w organizmach roślinnych lub mikrobiomie glebowym? Jakie dalsze badania mogłyby to potwierdzić?

Podsumowanie oceny merytorycznej

Przedstawiona do oceny praca dotyczy nowatorskiego i aktualnego zagadnienia, jakim jest wpływ cieczy jonowych o działaniu herbicydowym (HILs) na środowisko. Badania nad ich skutecznością, toksycznością oraz biodegradowalnością stanowią istotny wkład w rozwój pro-środowiskowych technologii ochrony roślin. Na szczególne wyróżnienie zasługuje interdyscyplinarny charakter pracy. Rozprawa łączy zaawansowane metody chemiczne, biologiczne i mikrobiologiczne. Obejmuje szeroką analizę wpływu HILs na rośliny, mikroorganizmy oraz mechanizmy biodegradacji, co czyni ją opracowaniem o dużej wartości

naukowej. Autor zastosował nowoczesne techniki analityczne, takie jak spektroskopia NMR, IR, testy MIC, MBC, EC₅₀, badania biodegradacji, analizy metagenomiczne, PCR oraz qPCR. Wysoki poziom zastosowanej metodyki podkreśla solidność naukową pracy. Ważnym aspektem pracy jest jej praktyczny charakter. Wyniki badań mogą przyczynić się do opracowania bardziej zrównoważonych i mniej toksycznych herbicydów, co wpisuje się w strategię Europejskiego Zielonego Ładu i koncepcję rolnictwa regeneratywnego. Praca odnosi się do zaostrzających się regulacji prawnych dotyczących ochrony roślin i może stanowić cenne źródło wiedzy dla naukowców, decydentów oraz producentów środków ochrony roślin. Praca jest starannie napisana i dobrze ustrukturyzowana. Zawiera klarownie określone cele, metody, wyniki oraz wnioski, co świadczy o wysokim poziomie umiejętności autora w zakresie komunikacji naukowej. Warto podkreślić, że wyniki badań zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych, co potwierdza ich wysoką wartość merytoryczną i znaczenie dla międzynarodowej społeczności naukowej. Podsumowując, praca mgr inż. Jana Homa spełnia najwyższe standardy naukowe i ma istotne znaczenie dla rozwoju zrównoważonych technologii herbicydowych, co w pełni uzasadnia jej wyróżnienie.

Wniosek końcowy

Podsumowując uważam, że recenzowana rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a tym samym spełnia warunki stawiane tego typu opracowaniom określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity: Dz.U. z 2021r. poz. 478. Na tej podstawie składam wniosek do Rady Naukowej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Poznańskiej o dopuszczenie mgr inż. Jana Homa do dalszych etapów przewodu doktorskiego i ze względu na wartość merytoryczną uzyskanych wyników oraz sposób ich prezentacji wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Prof. dr hab. Łukasz Drewniak

