

Szczecin, 19 czerwca 2024 r.

dr hab. inż. Agata Witczak
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Tel.: 91 449 6550
e-mail: awitczak@zut.edu.pl

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr inż. Pauliny Książek-Treli
pt.: „ Wpływ komercyjnych preparatów mikrobiologicznych na degradację herbicydów i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych”

(Recenzję wykonano na zlecenie Rady Naukowej Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego – Uchwała nr 242/04/2024), na podstawie pisma CN/69/2024/Z z dnia 25.04.2024)

Ogólna charakterystyka i podstawa formalna oceny rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem Promotora Pani dr hab. inż. Ewy Szpyrki, prof. UR oraz Promotora pomocniczego Pana Dr Leszka Potockiego w Instytucie Biotechnologii, Katedrze Biotechnologii Uniwersytetu Rzeszowskiego, w dziedzinie *nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biotechnologia*.

Praca została przygotowana zgodnie z warunkami stawianymi rozprawom doktorskim, określonymi w art. 187 Ustawy z 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

Na opiniowaną rozprawę składa się cykl czterech publikacji, w tym trzech oryginalnych prac naukowych oraz jednej pracy o charakterze przeglądowym. Powyższe prace są ze sobą tematycznie ściśle związane, przedstawiają możliwości dostępnych w sprzedaży preparatów mikrobiologicznych, do degradacji wybranych herbicydów oraz wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, należących do trwałych zanieczyszczeń organicznych. Publikacje ukazały się w latach 2022-2024 w recenzowanych, anglojęzycznych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym z IF, tym samym zostały już wcześniej ocenione przez specjalistów z danej dziedziny.

Do wszystkich publikacji dołączono oświadczenia współautorów. Wynika z nich, że wkład Autorki dysertacji, w mojej opinii, był znaczący, został przedstawiony w załączonych oświadczeniach w sposób opisowy, bez oszacowania procentowego. Pani Magister była również autorem korespondencyjnym we wszystkich pracach. Rolą Doktorantki było, m.in., sporządzenie przeglądu literatury, udział w przygotowywaniu próbek do analiz chromatograficznych WWA i pestycydów, prowadzenie doświadczeń, praca nad przygotowaniem manuskryptów, korekta prac.

Prace wchodzące w skład dysertacji zostały oznakowane numerami od 1 do 4:

Publikacja 1. Książek-Trela P., Szpyrka E. 2022. The effect of natural and biological pesticides on degradation of synthetic pesticides. *Plant Protection Science* 58(4), 273–291. DOI: 10.17221/152/2021-PPS. IF₂₀₂₂ – 1,3; MEiN₂₀₂₂ – 100 pkt. (Szacowany wkład Doktorantki w przygotowanie pracy polegał na sporządzeniu przeglądu literatury, przygotowaniu manuskryptu razem z promotorem, a także pełnieniu obowiązków autora korespondencyjnego i przygotowaniu korekty razem z Promotorem).

Publikacja 2. Szpyrka E., Książek-Trela P., Bielak E., Słowik-Borowiec M. 2024. The influence of commercial yeast preparations on the degradation of herbicide mixtures in the soil and the effect on the shell pea (*Pisum sativum* L.) cultivation. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. DOI:10.1007/s42729-024-01671-7. IF₂₀₂₂ – 3,9; MEiN₂₀₂₄ – 100 pkt. (Szacowany wkład Doktorantki w przygotowanie pracy polegał na współprowadzeniu doświadczenia nad zanikaniem pestycydów w glebie, oznaczeniu zawartości barwników w roślinach, wspólnej z promotorem analizie wyników, a także pełnieniu obowiązków autora korespondencyjnego i przygotowaniu korekty razem z Promotorem).

Publikacja 3. Książek-Trela P., Bielak E., Węzka D., Szpyrka E. 2022. Effect of three commercial formulations containing effective microorganisms (EM) on diflufenican and flurochloridone degradation in soil. *Molecules* 27(14), 4541. DOI: 10.3390/molecules27144541. IF₂₀₂₂ – 4,6; MEiN₂₀₂₂ – 140 pkt. (Szacowany wkład Doktorantki w przygotowanie pracy polegał na współudziale w wykonaniu analiz techniką GC-MS/MS, przygotowaniu próbek gleby metodą QuEChERS do oznaczania pozostałości herbicydów, wspólnej z promotorem analizie i interpretacji wyników, opracowaniu treści manuskryptu, a także pełnieniu obowiązków autora korespondencyjnego razem z Promotorem).

Publikacja 4. Książek-Trela P., Figura D., Węzka D., Szpyrka E. 2024. Degradation of a mixture of 13 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by commercial effective microorganisms. *Open Life Sciences* 19(1), 20220831. DOI: 10.1515/biol-2022-0831. IF₂₀₂₂ – 2,2; MEiN₂₀₂₄ – 40 pkt. (Szacowany wkład Doktorantki w przygotowanie pracy nr 4 polegał na współudziale w przygotowaniu ekstraktów z próbek gleby metodą QuEChERS do oznaczania WWA, analizie aktywności enzymatycznej, interpretacji wyników razem z Promotorem, opracowaniu treści manuskryptu, a także pełnieniu obowiązków autora korespondencyjnego oraz wykonaniu korekty razem z Promotorem).

Wszystkie prace zostały przygotowane przez Doktorantkę we współautorstwie z Promotorem jednak bez udziału Promotora pomocniczego.

W trzech publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, zaś w jednej pracy drugim. Wartość punktowa cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe jest wysoka, wg klasyfikacji punktowej czasopism Ministerstwa Edukacji i Nauki (od 1.01.2024 r. Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego) wynosi **380**, a sumaryczny Impact Factor **IF = 12**.

Poza publikacjami wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej, zamieszczono w niej streszczenie w języku polskim i angielskim, a następnie omówienie problematyki badań przedstawionych w załączonych publikacjach w formie krótkich rozdziałów, tj.: Wstęp, obejmujący uzasadnienie wyboru tematu, Hipoteza badawcza i cele badań, Omówienie publikacji, Podsumowanie. Rozprawę zakończono spisem cytowanej literatury. Całość liczy łącznie 76 stron, a z publikacjami i oświadczeniami współautorów 176 stron. Przedstawioną rozprawę kończy życiorys naukowy Doktorantki, pozwalający dostrzec inne aspekty działalności Pani mgr inż. Pauliny Książek-Treli, np. uczestnictwo w konferencjach krajowych i międzynarodowych, w warsztatach promocyjnych dla młodzieży, udział w badaniach na rzecz podmiotów gospodarczych.

Tytuł rozprawy został sformułowany w sposób zwięzły i jasny, w pełni odpowiada głównemu tematowi podjętemu w pracy.

Ocena wartości merytorycznej

Podczas pracy w rolnictwie związanej z uprawą różnego rodzaju roślin, stale istnieje konieczność podejmowania walki z patogenami, chwastami i inwazjami szkodników, co wymusza stosowanie strategii obronnej w postaci środków ochrony roślin, do których m.in. należą herbicydy, fungicydy czy insektycydy. Dostępność środków ochrony roślin, z których najpowszechniej stosowane są herbicydy, przyczyniła się do ich powszechnego użycia, co przynosi istotne korzyści ekonomiczne, jednak przyczynia się do zanieczyszczenia środowiska, utraty różnorodności biologicznej, a także pojawiania się organizmów

szkodliwych, odpornych na środki ochrony roślin. Przy stosowaniu pestycydów, zawsze powstaje problem ich czasu rozpadu po spełnieniu swojej funkcji biobójczej. Poza tym konsekwencją jest coraz częstsze występowanie w surowcach żywnościowych multi pozostałości pestycydów. Celem IPM jest ograniczenie do minimum stosowania środków chemicznych na rzecz wprowadzania preparatów biologicznych, które jednocześnie mogą oddziaływać, np. stymulująco na rozwój roślin i ich procesy życiowe, poprawiać strukturę i żyzność gleby, a także wpływać na bioróżnorodność poprzez zwiększenie aktywności mikroorganizmów glebowych. W procesie biodegradacji pestycydów istotną rolę odgrywają bakterie i grzyby, które wykorzystują te substancje jako składniki odżywcze i źródło energii. Jednak problem degradacji mikrobiologicznej tych substancji czynnych jest złożony, istotne znaczenie ma wiele czynników, m.in. liczba i rodzaj mikroorganizmów, aktywność metaboliczna danego mikroorganizmu, odporność mikroorganizmu na warunki środowiska, stężenie i budowa chemiczna związku, złożone warunki środowiskowe., które decydują o stopniu i kierunku degradacji.

Tematykę podjętą przez Doktorantkę, dotyczącą poszukiwania alternatywnych sposobów wcześniejszego zaniku wybranych herbicydów w glebie, uważam za niezwykle istotną, nie tylko z ekonomicznego i ekologicznego punktu widzenia, ale także bezpieczeństwa żywności i zdrowia konsumenta. Jak słusznie zauważyła Doktorantka, oprócz środków ochrony roślin, zagrożenie dla zdrowia konsumentów stanowić mogą również pozostałości trwałych zanieczyszczeń organicznych, w tym WWA, obecnych w glebie, które pobierane są przez rośliny uprawne. WWA to związki o różnej trwałości w środowisku, zmiennej toksyczności, charakteryzujące się działaniem rakotwórczym, toksycznym, mutagennym, immunosupresyjnym. Temat degradacji WWA przez bakterie i grzyby, jest dość dobrze poznany, natomiast można znaleźć niewiele doniesień dotyczących wykorzystania w tym celu drożdży. Dlatego podjęty przez Panią Magister temat uważam za niezwykle istotny w kontekście remediacji gleb zanieczyszczonych przez WWA.

Swoje badania Doktorantka oparła o założoną hipotezę badawczą:

1. komercyjne preparaty mikrobiologiczne, a w szczególności zawierające mieszaniny mikroorganizmów, tzw. mikroorganizmy efektywne (EM), mogą wpływać na przyspieszenie rozkładu herbicydów i WWA w glebie.

Weryfikacji hipotezy dokonała wytyczając jasno sprecyzowane cele, a mianowicie:

- cel główny - określenie wpływu wybranych komercyjnych preparatów mikrobiologicznych na degradację herbicydów (publikacje **2, 3**) i degradację WWA (publikacja **4**).
- cel cząstkowy - analiza wpływu preparatów mikrobiologicznych na parametry fizyko-chemiczne gleby, tj. pH i potencjał oksydo-redukcyjny (ORP) oraz aktywność dehydrogenazy (DHA) (publikacje **2, 3, 4**).
- cel cząstkowy – analiza wpływu preparatów drożdżowych na wzrost i zdrowotność roślin uprawianych na glebach zanieczyszczonych herbicydami (publikacja **2**).

Prace badawcze przedstawione w niniejszej rozprawie zostały poprzedzone dogłębną analizą literatury (**Publik. 1**), która pozwoliła na wybór mikroorganizmów o największych zdolnościach do biodegradacji różnych grup herbicydów oraz wybór preparatów zawierających odpowiednie mikroorganizmy efektywne (EM). Na podstawie literatury Autorka stwierdziła, że najbardziej efektywnymi mikroorganizmami w IPM są bakterie z rodzajów *Bacillus* spp. i *Pseudomonas* spp., grzyby z rodzaju *Trichoderma* spp. oraz drożdże *S. cerevisiae*. Wykazują one skuteczność w degradacji wielu pestycydów, a także są obecne w dostępnych na rynku preparatach komercyjnych.

Na podkreślenie zasługuje jasny schemat prezentujący cały zakres badań z poszczególnych

publikacji pracy doktorskiej (str. 22). Jest on niezwykle przydatny do oglądu całości pracy. W mojej opinii mógłby się znajdować jednak w rozdziale Hipotezy badawcze i cele badań.

W publikacji **2** Autorka skupiła się na zagadnieniu wpływu preparatów biologicznych zawierających drożdże (*Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* i *Debaryomyces hansenii*) na zanikanie herbicydów w glebie. Doktorantka wykazała, że preparaty te mogą zmniejszać zanieczyszczenie gleby herbicydami, a najbardziej skuteczny okazał się preparat zawierający *Y. lipolytica*. Przy czym % degradacji w teście 28 dniowym wahał się od 5,3% dla trwałej pendimetaliny do 71,2% dla fluazyfopu-P-butylu. Realizując cele cząstkowe, na podstawie parametrów takich jak pH gleby, potencjał oksydacyjno-redukcyjny (ORP), wilgotność, aktywność dehydrogenazy mikroorganizmów (DHA), wykazała także pozytywny wpływ preparatów drożdżowych na rekultywację gleby. Doktorantka dowiodła również, że mieszanina herbicydów znacznie ograniczyła kiełkowanie nasion, a preparaty z EM sprzyjały wzrostowi grochu zwyczajnego (*Pisum sativum* L.) (*Yarrowia lipolytica* 22%), a także zwiększyły zdolność kiełkowania nasion (*Debaryomyces hansenii* 30%). Współczynnik kiełkowania w glebie z tym preparatem był wyższy o 30% niż w glebie zanieczyszczonej mieszaniną herbicydów, a także o 3,4% wyższy niż w glebie czystej.

W publikacji **3** Autorka dowiodła, że wpływ EM na zmianę zawartości herbicydów nie zawsze jest jednoznacznie pozytywny, o czym świadczy hamowanie degradacji diflufenikanu pod wpływem preparatów biologicznych, zawierających zarówno bakterie jak i drożdże. Uwzględniając dynamikę rozkładu związków w glebie, opisywaną często równaniem kinetyki pierwszego rzędu, Doktorantka określiła również czasy półtrwania analizowanych herbicydów. Taka informacja pozwala ograniczyć stosowanie substancji, która ze względu na swoją persystencję może stanowić zagrożenie dla środowiska. Jako element bezpieczeństwa żywności ma też wpływ na okres karencji pestycydów.

Aby zweryfikować część postawionej hipotezy badawczej dotyczącą możliwości degradacji związków WWA przez EM, Autorka zastosowała mieszaninę 13 związków, odzwierciedlającą w przybliżeniu warunki występujące w środowisku naturalnym (publikacja **4**). Stwierdziła, że po 35 dniach stężenie WWA spadło o 75,5–95,5%. Wykazała także różnice w rozkładzie poszczególnych WWA przez pojedyncze mikroorganizmy oraz przez konsorcja bakterii i drożdży, przy czym najwyższą skuteczność degradacji WWA uzyskano dla fluorenu stosując preparat zawierający osiem szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus*.

Podkreślić należy, że przed przystąpieniem do analiz, których wyniki obejmuje rozprawa doktorska (publikacje **2, 3, 4**), Pani Magister wraz ze współautorami, opracowała zwalidowaną metodę do jednoczesnej identyfikacji i oznaczania ilościowego 94 pestycydów i 13 wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w różnych matrycach, obejmujących zarówno żywność jak i glebę (Słowik-Borowiec M, Szpyrka E, Książek-Trela P, Podbielska M. 2022. *Simultaneous Determination of Multi-Class Pesticide Residues and PAHs in Plant Material and Soil Samples Using the Optimized QuEChERS Method and Tandem Mass Spectrometry Analysis. Molecules 27:2140*). Kompleksowe badania, realizujące założone cele, wykonano w warunkach kontrolowanych z zastosowaniem nowoczesnego warsztatu analitycznego, uwzględniającego techniki spektrofotometryczne oraz chromatograficzne (GC – MS/MS). Świadczy to o umiejętnościach analitycznych Doktorantki, tj. o znajomości zaawansowanych specyficznych technik laboratoryjnych, umiejętności ich wykorzystania oraz interpretacji uzyskanych wyników.

Podsumowując merytoryczną ocenę pracy stwierdzam, że publikacje stanowiące rozprawę doktorską Pani mgr inż. Pauliny Książek-Treli stanowią oryginalny dorobek naukowy, wnoszący istotny wkład w rozwój dyscypliny naukowej. Są one spójne tematycznie, dobrze zaplanowane. Podkreślić należy

bardzo dobry warsztat badawczy Pani Magister, począwszy od aktywnego uczestnictwa w przygotowaniu doświadczeń, po umiejętność doboru i opanowania specjalistycznych metod analizy pestycydów i WWA oraz weryfikacji i interpretacji uzyskanych wyników. Świadczy to o umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych, dociekliwości, umiejętności planowania i organizacji prac badawczych, w oparciu o posiadaną szeroką wiedzę, niezbędną do ubiegania się o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych.

Biorąc pod uwagę naukową i aplikacyjną wartość badań, należy podkreślić, że cele postawione w rozprawie doktorskiej są trafne i odpowiadają na aktualny problem, jakim jest ciągła i często trudna do przewidzenia presja ze strony chwastów i szkodników, na rośliny podczas ich okresu wegetacyjnego, co istotnie obniża jakość i wydajność plonów oraz prowadzi do niekorzystnych zmian metabolicznych w roślinach. Praktycznym, aplikacyjnym aspektem jest możliwość wykorzystania ogólnodostępnych na rynku nawozowych produktów mikrobiologicznych dodatkowo do redukcji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA), co pozwala zastosować te preparaty w remediacji gleb, np. na obszarach szczególnie zanieczyszczonych.

Uzyskane wyniki badań potwierdziły, że preparaty mikrobiologiczne, w tym bakteryjne i drożdżowe, mają istotny wpływ na degradację siedmiu herbicydów, z wyjątkiem diflufenikanu, mogą mieć działanie wspierające tradycyjne środki ochrony roślin, jak również mogą być stosowane alternatywnie. Ich stosowanie powinno być rekomendowane, jako działanie proekologiczne, zgodne z IPM. Biorąc pod uwagę wpływ badanych biopreparatów na degradację WWA, stwierdzono skuteczność w zakresie 70-95%, przy czym nieco niższą w przypadku samych drożdży. Ponadto uzyskane wyniki jednoznacznie potwierdziły, że degradacja mikrobiologiczna w wykorzystaniem EM jest skuteczna i badania w tym kierunku powinny być kontynuowane.

Uwagi

- Ponieważ na skuteczność biologicznych ś.o.r. wpływa wiele czynników, takich jak rodzaj i stan gleby, warunki pogodowe, sposób aplikacji, dawkowanie oraz skład konkretnego preparatu i inne nieprzewidywalne czynniki, istotnym z punktu widzenia praktycznego byłoby przeniesienie niektórych z przeprowadzonych doświadczeń na warunki polowe i ewentualne potwierdzenie zaobserwowanych skutków działania tych preparatów.
- Czy planowała Pani doświadczenie z wykorzystaniem różnych rodzajów gleb?
- Dlaczego degradację WWA obserwowano tylko w 35 dniu doświadczenia, zaś zmiany pH, ORP, DHA w 1, 4, 14 i 35 dniu?
- Drobne błędy:
 - Błędy literowe w publikacji 2 – na rysunkach 1, 2 , 3 , 4 - zamiast słowa „herbicide” wielokrotnie figuruje „heribcide”, „hebicide”; również na rys. 14 rozprawy.
 - str. 9 – winno być Rozp. (WE) 396/2005 ze zmianami
 - str. 10-12 – od 1.01.2024 nastąpiła zmiana kwalifikacji HRAC, wprowadzono oznaczenia liczbowe herbicydów (ujednoczenie HRAC i amerykańk. WSSA)
 - str. 14 – cytowanie winno być IUNG 2020
 - str. 14 – cytowanie rozporządzeń winno być z podaniem numeru rozporządzenia
 - str. 19 – brak numeru cytowanej ustawy
 - str. 40 – „Pozostałości herbicydów oznaczano metodą QuEACHERS” – próbki do analiz przygotowywano metodą QuEACHERS i oznaczano metodą GC MS/MS.

Wnioski

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji praca doktorska **Pani mgr inż. Pauliny Książek-Treli** spełnia ustawowe kryteria stawiane pracom doktorskim, zgodnie z Ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 30 sierpnia 2018 r. poz. 1668 z późniejszymi zmianami), tj.:

- a) prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktoranta w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie biotechnologia,
- b) potwierdza, że Doktorantka potrafi samodzielnie prowadzić badania naukowe,
- c) rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej.

Biorąc powyższe pod uwagę wnioskuję do Rady Naukowej Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie jej do publicznej obrony.