Abstract

Phenoxy herbicides (PHs), i.e. 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and MCPA (2- methyl-4-chlorophenoxyacetic acid), are widely used to control broadleaf plants in order to protect and improve yields of crops. Their overuse and wrong storage practices cause uncontrolled spread of PHs residuals in the environment and promote sediments, surface- and groundwater contamination. They pose a potential risk for growth and health of living organisms. Hence, the development of nature-based solutions, which employ the properties of ecosystems in order to detoxify the environment, is an important tool for removal of those pollutants. The orchestrated network of interactions between microorganisms, plants and plants' exudates (i.e. plant secondary metabolites; PSMs) can significantly contribute to an effective detoxification of soil. Thus, the integration of phyto- and bioremediation (rhizobacteria- or endophyte-assisted phytoremediation) techniques constitutes a promising tool for PHs removal from soil ecosystems.

The main aim of the present study was to verify two research hypotheses: **H1:** *Cucurbits and their characteristic secondary metabolites (ferulic acid - FA and syringic acid - SA) stimulate the biodegradation potential of soil and plant-associated bacteria for removal of structurally related PHs (2,4-D and MCPA)*; **H2:** *Selected PSMs mitigate the toxic effect of structurally related phenoxy herbicides on the environment*. PSMs were selected on the basis of their structural similarity to phenoxy herbicides (2,4-D vs. FA; MCPA vs. SA).

For the purpose of this PhD study, the experiments were divided into two subsections: microbial cultures and greenhouse experiments. To verify the effects of selected cucurbits and PSMs (SA and FA) on the biodegradation potential of soil and plant-associated bacteria toward removal of chosen PHs (**H1**) the following aspects were evaluated: (1) the presence of bacterial *tfdA* genes, (2) the functional diversity of soil microbiota using Biolog® EcoPlates, (3) the structural diversity of soil and plant-associated bacterial communities using new generation sequencing; (4) and the changes in PHs concentrations using chromatographic and immuno-enzymatic analyses. The toxicity of the environment was assessed by: (**1**) using two commercial biotests (Phytotoxkit® and Microtox®) and (**2**) measuring growth and physiological parameters of chosen cucurbits (zucchini and cucumber).

The findings confirmed the stimulating effect of cucurbits and their characteristic PSMs on the biodegradation potential of soil and plant-associated bacterial communities toward PHs. However, this stimulating effect depended on the used PH-PSM pair and the initial concentrations of PHs. Among chosen PH-PSM pairs, SA showed a higher stimulating effect

on biodegradation of MCPA, reflected in bigger number of detected functional *tfdA* amplicons. However, this effect was observed only when lower concentration of MCPA was used. Subsequent greenhouse experiments showed that the enrichment of MCPA-contaminated soil with SA increased the microbial activity of the soil microbiome, suggesting its higher potential for the herbicide removal. Structural diversity analysis also revealed that amendment of soil with SA promotes the occurrence of bacterial taxa that can potentially support the biodegradation of PHs. The chemical measurements confirmed the stimulating effect of the chosen PSM (SA) on MCPA removal, and toxicity assessments proved SA to have a higher potential to mitigate the toxic effect of the herbicide (MCPA).

The results obtained in the frame of the doctoral dissertation verified the two stated hypotheses: the stimulating effect of selected cucurbit (zucchini) and its PSM (SA) on the potential of soil and plant-associated bacteria for removal of MCPA, and mitigating effect of SA on the toxicity of MCPA-contaminated matrices, were confirmed. In addition, the performed experiments and obtained findings brought an insight into the complex processes and interactions between plants, their PSMs and plant-associated bacteria in remediation of soils contaminated with PHs.

.....

24.02.2022 Łódź, Elżbieta Mierzejewska

Streszczenie

Herbicydy fenoksykwasowe (HF), tj. 2,4-D (kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy) i MCPA (kwas 2-metylo-4-chlorofenoksyoctowy), są szeroko stosowane do zwalczania chwastów dwuliściennych w celu ochrony i poprawy plonów. Ich nadużywanie i niewłaściwe przechowywanie powodują niekontrolowane rozprzestrzenianie się pozostałości HF w środowisku, a w konsekwencji zanieczyszczenie gleb, wód powierzchniowych i gruntowych oraz osadów dennych. Dodatkowo, badania monitoringowe wykazały, że pozostałości HF w środowisku są szkodliwe dla organizmów żywych. Dlatego też opracowanie rozwiązań opartych na przyrodzie (ang. *nature-based solutions*; NBS), które wykorzystują właściwości ekosystemów w celu poprawy jakości środowiska, jest ważnym krokiem w usuwaniu tych zanieczyszczeń. Wykorzystanie zależności między mikroorganizmami, roślinami i eksudatami roślinnymi (tj. roślinnymi metabolitami wtórnymi; WMR) może znacząco przyczynić się do skutecznej detoksykacji gleby. Zatem integracja technik fito- i bioremediacji (fitoremediacja wspomagana przez ryzobakterie lub endofity) stanowi obiecujące narzędzie do usuwania HF z ekosystemów glebowych.

Biorąc pod uwagę powyższe, głównym celem niniejszej pracy doktorskiej była weryfikacja dwóch hipotez badawczych: 1) *Dyniowate i ich charakterystyczne wtórne metabolity (kwas ferulowy – KF i kwas syryngowy – KS) stymulują potencjał biodegradacyjny bakterii glebowych i roślinnych do usuwania strukturalnie podobnych PH (2,4-D i MCPA)*; 2) *Wybrane WMR łagodzą toksyczny wpływ strukturalnie pokrewnych HF na środowisko. WMR zostały wybrane na podstawie ich podobieństwa strukturalnego do HF (2,4-D vs. KF; MCPA vs. KS)*.

Eksperymenty realizowane w ramach pracy doktorskiej zostały podzielone na dwie sekcje: hodowle płynne mikroorganizmów glebowych oraz hodowle roślin dyniowatych w warunkach szklarniowych. W celu weryfikacji wpływu wybranych dyniowatych i WMR (KS i KF) na potencjał biodegradacyjny bakterii glebowych i roślinnych w kierunku usuwania wybranych HF, zbadano: 1) obecność genów bakteryjnych *tfdA*, 2) różnorodność funkcjonalną mikroorganizmów z wykorzystaniem systemu Biolog® EcoPlates, 3) różnorodność strukturalną bakterii glebowych i roślinnych z wykorzystaniem sekwencjonowania nowej generacji; 4) i zmiany stężenia HF z wykorzystaniem analiz chromatograficznych i immmunoenzymatycznych. Toksyczność środowiska oceniano poprzez: 1) zastosowanie dwóch komercyjnych biotestów (Phytotoxkit® i Microtox®); oraz 2) pomiar parametrów morfologicznych i fizjologicznych wybranych dyniowatych (cukinii i ogórka).

Obserwacje potwierdziły stymulujący wpływ dyniowatych i ich charakterystycznych WMR na potencjał biodegradacji gleb w kierunku usuwania HF. Należy podkreślić iż efekt ten zależał od wybranych HF oraz WMR oraz zastosowanych stężeń HF. KS wykazywał szczególnie pozytywny wpływ na biodegradację MCPA, co wykazały analizy molekularne potwierdzające większą liczbę wykrytych genów funkcyjnych *tfdA* w wariantach z dodatkiem KS i MCPA. Jednak efekt ten zaobserwowano tylko przy zastosowaniu niższych stężeń herbicydu. Kolejne eksperymenty szklarniowe wykazały, że dodatek KS do gleby zanieczyszczonej MCPA wpłynął pozytywnie na aktywność mikroorganizmów glebowych, co wskazuje na wyższy potencjał mikroflory glebowej do usuwania herbicydów. Dalsze analizy różnorodności strukturalnej bakterii glebowych, ryzosferowych i endofitów, wykazały, że zarówno MCPA jak i KS, wpływa pozytywnie na obecność bakterii z rodzajów, które mogą potencjalnie przyczyniać się do biodegradacji HF. Jednocześnie analizy chromatograficzne i immunoenzymatyczne stężenia MCPA potwierdziły stymulujący wpływ SA na usuwanie tego herbicydu, a oceny toksyczności wykazały, że SA ma wyższy potencjał łagodzenia toksycznego działania MCPA.

Biorąc pod uwagę powyższe, wyniki uzyskane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wykazały słuszność postawionych hipotez: potwierdzono stymulujący wpływ KS oraz hodowli cukinii na usuwanie MCPA z gleby oraz wykazano łagodzący wpływ KS na toksyczność zanieczyszczonych matryc. Wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej pozwoliły uzyskać wgląd w złożone procesy interakcji pomiędzy roślinami, ich WMR oraz mikroorganizmami w remediacji gleby zanieczyszczonej HF.

.....

24.02.2022 Łódź, Elżbieta Mierzejewska