

Bydgoszcz 2.04.2020

dr hab. inż. Joanna Lemanowicz, profesor uczelni
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy
Wydział Rolnictwa i Biotechnologii
Katedra Biogeochemii i Gleboznawstwa
ul. Bernardyńska 6
85-029 Bydgoszcz

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Barbary Pawłowskiej

pt.

**Reakcja siewek jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.) na obecność cieczy jonowych
w glebie**

Recenzja została napisana w odpowiedzi na pismo Pana dr. hab. inż. Edwarda Mellera, prof. ZUT, Dziekana Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa w Szczecinie. Przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr Barbary Pawłowskiej została wykonana na Wydziale Nauk Ścisłych, Biotechnologii i Ekotoksykologii Uniwersytetu Humanistyczno-Przyrodniczego im. Jana Długosza w Częstochowie. Promotorem rozprawy jest Pan dr hab. Robert Biczak, prof. UJD. Rozprawa doktorska została wykonana w dyscyplinie naukowej *agronomia*.

Problematyka badawcza

Problematyka, którą mgr Barbara Pawłowska podjęła w pracy jest bardzo aktualna i interesująca i jakże ważna zarówno z punktu widzenia poznawczego jak i aplikacyjnego. W ostatnich latach coraz większą uwagę przykładają się do ograniczenia wpływu zanieczyszczeń antropogenicznych (np. substancji ropopochodnych, emisji spalin, metali ciężkich). Związki te mogą niekorzystnie oddziaływać na rośliny, co w przypadku rolnictwa wiąże się ze znacznym obniżeniem plonu. Ciecze jonowe (ang. *ionic liquids*, ILs) są definiowane jako związki chemiczne o budowie jonowej, które charakteryzują się temperaturą topnienia poniżej 100°C. Dzięki swoim właściwościom i nieograniczonym możliwościom syntezy znalazły zastosowanie zarówno w gałęziach przemysłu jak i w rolnictwie. Początkowo były traktowane jako „zielone rozpuszczalniki” bezpieczne

dla środowiska. Jednak okazało się, że wiele z nich ma charakter toksyczny i ich obecność w środowisku przyrodniczym może powodować u roślin np. nadprodukcję reaktywnych form tlenu (RFT) i prowadzić do powstania tzw. stresu oksydacyjnego. Wpływa to na ograniczenie wzrostu i rozwoju roślin a nawet do ich śmierci. W celu ochrony komórek, w roślinach funkcjonuje system antyoksydacyjny, odpowiadający za usuwanie RFT: drobnocząsteczkowe antyutleniacze (np. glutation, karoteonidy, witamina C) oraz enzymy antyoksydacyjne (np. dysmutazy ponadtlenkowe, peroksydaza glutationowa, katalaza, reduktaza glutationowa). Pojawienie się czynników stresowych na etapie kiełkowania nasion i początkowego wzrostu roślin (najważniejszych faz wzrostu roślin) to jeden z większych problemów, z którym w obecnej dobie musi zmierzyć się rolnictwo. Zatem szeroko zakrojone badania nad wpływem wybranych cieczy jonowych na reakcję siewek jęczmienia jarego są bardzo cenne. Zmiany aktywności enzymów są wczesnym sygnałem zmian zachodzących procesów zarówno w glebie jak i roślinie, dlatego enzymy nazywane są biomarkerami określającymi wpływ różnych związków chemicznych na środowisko. Wybór tematu rozprawy doktorskiej pt': „Reakcja siewek jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.) na obecność cieczy jonowych w glebie” jest więc uzasadniony, a tematyka badań niezmiernie ważna. Zasadniczym celem podjętym przez Doktorantkę było określenie w jaki sposób obecność w glebie cieczy jonowych (chlorki amoniowe i imidazolowe) oraz długość ekspozycji na te związki chemiczne wpływa na wzrost i rozwój siewek jęczmienna jarego. Jednocześnie, Doktorantka dokonała próby odpowiedzi na pytanie, czy badane ciecze będą mogły być traktowane jako związki o potencjalnych właściwościach chwastobójczych. Na podstawie uzyskanych wyników, zweryfikowanych statystycznie Doktorantka dokonała oceny wpływu wybranych cieczy jonowych.

Formalna analiza rozprawy

Przedłożona do oceny rozprawa została przygotowana w oparciu o oryginalne wyniki badań własnych, zrealizowanych przez Autorkę w ramach doświadczenia laboratoryjnego. Tytuł pracy w pełni oddaje istotę rozprawy. Rozprawa liczy łącznie 148 numerowanych stron i zawiera 25 tabel zamieszczonych w tekście pracy, które zawierają opracowane statystycznie wyniki i 35 barwnych rysunków (wykresy oraz zdjęcia cyfrowe), które są wykonane na profesjonalnym poziomie przez co wpływają korzystnie na odbiór jej treści przez czytelnika. Struktura rozprawy została przygotowana w układzie klasycznym dla prac doktorskich, według ogólnie przyjętego schematu. Całość jest podzielona na 9 głównych części. Są to: STRESZCZENIE, SUMMARY, WSTĘP, CEL PRACY, CZĘŚĆ

TEORETYCZNA – PRZEGLĄD LITERATURY (obejmująca: 1. Ciecze jonowe oraz 2. Stres oksydacyjny u roślin), CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA (podzielona na: 1. Materiał i metody badan, 2. Wyniki badan i dyskusja oraz 3. Możliwości wykorzystania uzyskanych wyników badań w praktyce), WNIOSKI, LITERATURA oraz bogaty DOROBEK NAUKOWY, który dopełnia całości dysertacji.

Autorka wyróżniła liczne podrozdziały, których układ jest przemyślany i logiczny, co ułatwia studiowanie pracy. Literatura jest obszerna i obejmuje 254 pozycje literatury, większość anglojęzycznych (207 pozycji – ponad 81%). Wysoce pozytywnie oceniam to, że wykorzystano 166 pozycji opublikowanych w latach 2010-2019. Tak obszerna literatura pozwoliła Doktorantce prawidłowo zaplanować analizy, przeprowadzić dyskusję wyników oraz wyciągnąć wnioski.

Rozprawa napisana jest stylistycznie poprawnym językiem, przez co czytelnik ma ułatwioną analizę uzyskanych wyników. Ma to szczególne znaczenie, gdyż problematyka podjęta przez Doktorantkę wymaga wprowadzenia precyzyjnej terminologii bez uproszczeń.

Merytoryczna analiza pracy

Treść pracy odpowiada tematowi określone w prawidłowo zredagowanym tytule. Autorka we wstępnej części rozprawy w rzetelny sposób zapoznaje czytelnika z cieczami jonowymi, stosunkowo nową grupą związków, mającą olbrzymie znaczenie w różnych gałęziach przemysłu, przez co wprowadza w problematykę podjętych badań. Streszczenie i Summary są wyważone, poprawne i przejrzyste.

Kolejną częścią pracy jest założenie ambitnego celu, który Autorka precyzuje jako określenie w jaki sposób obecność w glebie wybranych cieczy jonowych i długość ekspozycji na te związki chemiczne wpływa na wzrost i rozwój siewek jęczmienia jarego. Szczegółowe cele pracy, pozwalające na realizację celu głównego, obejmują:

- jaki wpływ na kiełkowanie nasion, wzrost i rozwój badanych roślin ma obecność w glebie cieczy jonowych,
- w jaki sposób czas kontaktu jęczmienia jarego z badanymi cieczami jonowymi przekłada się na fitotoksyczność tych związków, na zawartość barwników asymilacyjnych, biomarkerów stresu oksydacyjnego oraz na zmiany aktywności podstawowych enzymów antyoksydacyjnych w siewkach tego zboża.

Autorka jednak nie sformułowała hipotezy badawczej.

W CZĘŚCI TEORETYCZNEJ – PRZEGLĄD LITERATURY Autorka wyodrębniła 2 rozdziały i 6 podrozdziałów, wykorzystując liczne pozycje literatury, dobrane odpowiednio

do studiowanego zagadnienia i właściwego tematu badawczego. Ta część została napisana poprawnie pod względem merytorycznym. Na początku Doktorantka przybliżyła czytelnikowi czym są ciecze jonowe, jaka jest ich budowa i historię badań nad tymi związkami. Omawiając ciecze jonowe szczególną uwagę zwróciła na ich właściwości i zastosowanie, toksyczność oraz wykorzystanie jako herbicydy i regulatory wzrostu. Dzięki bogatej literaturze Doktorantka szczegółowo wyjaśnia na czym polega stres oksydacyjny u roślin, jego mechanizm i przyczyny jego powstawania.

Osiągnięcie założonego celu badań wymagało zgromadzenia i przygotowania odpowiedniego materiału badawczego oraz przygotowanie wysoce specjalistycznych badań, których wykonanie Doktorantka podała w CZEŚCI DOSWIADCZALNEJ. Do badań wybrano następujące ciecze jonowe: chlorek tetraetyloamoniowy ([TEA][Cl]), chlorek tetrabutylamoniowy ([TBA][Cl]), chlorek tetraoktyloamoniowy ([TOA][Cl]), chlorek 1-etylo-3-metyloimidazoliowy ([EMIM][Cl]), chlorek 1-butylo-3-metylpimidazoliowy ([BMIM][Cl]) oraz chlorek 1-metylo-3-oktyloimidazoliowy ([OMIM][Cl]). Badania dotyczące określenia oddziaływania cieczy jonowych na zmiany fizjologiczno-biochemiczne, w tym stres oksydacyjny w siewkach jęczmienia jarego odmiany Suwerek zostały przeprowadzone w Katedrze Biochemii, Biotechnologii i Ekotoksykologii, Uniwersytetu Humanistyczno-Przyrodniczego im. Jana Długosza w Częstochowie. Przed założeniem badań została zbadana gleba (piasek gliniasty), którą wykorzystano w eksperymencie wazonowym. Ciecze jonowe dodano w postaci roztworów wodnych o określonych stężeniach. Materiał roślinny do oznaczeń pobierany był w trzech terminach: w 7, 14 oraz 21 dniu od wysiania nasion do gleby.

W pracy użyto prawidłowych metod badawczych właściwie dobranych i zastosowanych, nie budzących zastrzeżeń merytorycznych. Uwzględnione metodyki poparte są źródłem literaturowym. W ramach doświadczenia laboratoryjnego Autorka określiła: potencjał kiełkowania nasion oraz ich zdolność kiełkowania, inhibicję długości korzenia i części nadziemnej roślin, inhibicję plonu świeżej masy siewek jęczmienia jarego, wyznaczenie wartości EC_{50} , poziom suchej masy, zawartość barwników asymilacyjnych (chlorofilu a, chlorofilu b, karotenoidów), zawartość podstawowych biomarkerów stresu oksydacyjnego (dialdehydu malonowego, H_2O_2 , wolnej proliny) oraz aktywność enzymów antyoksydacyjnych (katalazy, peroksydazy, dysmutazy ponadtlenkowej). Podjęcie powyższych badań świadczy o rzetelnym rozpoznaniu i opanowaniu przez Doktorantkę technik badawczych. Wskazuje jednocześnie, iż posiada umiejętności praktyczne. Ponadto,

dla odpowiedniej interpretacji uzyskanych wyników i wnioskowania przeprowadziła szereg analiz statystycznych, adekwatnych do uzyskanych wyników.

Bardzo ważnym elementem rozprawy jest odrębny rozdział Wyniki badań i dyskusja. Prawidłowe zaplanowanie i staranne wykonanie pracochłonnych badań, umożliwiło uzyskanie wielu interesujących a zarazem cennych danych. Autorka bardzo jasno i szczegółowo prezentuje otrzymane wyniki przeprowadzonych badań oraz prowadzi dyskusję z danymi literaturowymi. Wyniki badań zilustrowano w 13 tabelach i na 21 rysunkach, które zatytułowane są w sposób komunikatywny. Taki układ pozwolił na dokładne i zrozumiałe przedstawienie dużej ilości danych wynikowych.

Odrębnym, jakże cennym rozdziałem jest „Możliwość wykorzystania uzyskanych wyników badań w praktyce” w którym Autorka określa ewentualność wykorzystania aplikacyjnego badanych związków tj. oznaczenia potencjalnych właściwości fitotoksycznych wybranych cieczy jonowych dla chwastów. Do badań wazonowych wykorzystano żóltlice drobnokwiatową (*Galinsoga parviflora* Cav.) i szczaw zwyczajny (*Rumex acetosa* L.). Wszystkie parametry badań były identyczne jak w przypadku omawianych wcześniej badań przeprowadzonych dla jęczmienia jarego. Ciecze jonowe do oprysków zostały użyte w postaci roztworów wodnych w stężeniach 1,0% i 2,0%. Badania prowadzono przez 14 dni od momentu oprysku. Wskaźnikiem oceny toksyczności cieczy jonowych posłużyła ocena wizualna zahamowania wzrostu, powstałych uszkodzeń czy usychania badanych gatunków chwastów, co zostało udokumentowane. Oznaczono również zawartość chlorofili i karotenoidów. Uzyskane wyniki analiz wskazują, że badane ciecze jonowe zastosowane w postaci oprysków na rośliny testowe (z wyjątkiem chlorku tetraoktyloamoniowego) mają fitotoksyczny wpływ na chwasty.

Osiągnięcia wynikające z przeprowadzonych oryginalnych badań podsumowane zostały siedmioma wnioskami, które wypływają bezpośrednio z dyskusji. Są one sformułowane poprawnie, jednak brakuje wniosku podsumowującego. Do najważniejszych i najcenniejszych wniosków zawartych w pracy zaliczam:

Wykazanie, że aż z pięć z sześciu cieczy jonowych (tj. chlorek tetraetyloamoniowy, chlorek tetrabutylamoniowy, chlorek 1-etylo-3-metyloimidazoliowy, chlorek 1-butylo-3-metylpimidazoliowy oraz chlorek 1-metylo-3-oktyloimidazoliowy) wykazują fitotoksyczność i prowadzą do stresu oksydacyjnego.

Wykazanie wyższej toksyczności imidazoliowych cieczy jonowych w porównaniu do amoniowych.

Stwierdzenie, że największy wpływ na toksyczność miało zastosowane stężenie związku, następnie rodzaj związku i czas prowadzenia badań.

Wykazanie, że obecność w glebie chlorku tetraetyloamoniowy ([TEA][Cl]), chlorku tetrabutylamoniowy ([TBA][Cl]), chlorku 1-etylo-3-metyloimidazoliowy ([EMIM][Cl]), chlorku 1-butylo-3-metylpimidazoliowy ([BMIM][Cl]) oraz chlorku 1-metylo-3-oktyloimidazoliowy ([OMIM][Cl]) spowodowała spadek zawartości barwników asymilacyjnych w siewkach rośliny testowej. Jednocześnie w/w cieczy jonowe wpłynęły na wzrost proliny oraz nadtlenu wodoru, natomiast nie zanotowano jednoznacznych zmian zawartość dialdehydu malonowego.

Wykazanie, że w trakcie prowadzenia eksperymentu nastąpił spadek zawartości proliny, nadtlenu wodoru i dialdehydu malonowego.

Stwierdzenie, że stres oksydacyjny wywołany obecnością w glebie chlorku tetraetyloamoniowy, chlorku tetrabutylamoniowy, chlorku 1-etylo-3-metyloimidazoliowy, chlorku 1-butylo-3-metylpimidazoliowy oraz chlorku 1-metylo-3-oktyloimidazoliowy prowadzi do wzrostu aktywności peroksydazy w jęczmieniu jarym. Kierunek zmian aktywność katalazy i dysmutazy ponadtlenu jest niejednoznaczny. Badane cieczy jonowe zastosowane w postaci oprysków wykazują toksyczność w stosunku do dwóch gatunków chwastów (żóltlicy drobnokwiatowej i szczawiu zwyczajnego). Dane te mogą zostać w przyszłości wykorzystane podczas projektowania nowych związków o właściwościach chwastobójczych lub być w przyszłości wykorzystane jako środki chwastobójcze.

Wykaz literatury sporządzony jest profesjonalnie. Pojawiły się tylko nieliczne usterki np. w kilku przypadkach nazwy czasopism nie są pisane w skrótach [140,161,190,84,240,254, 253,254,251] lub brak konsekwencji w użyciu kursywy [121,125,156,161,186,236,239,249].

Bardzo wysoko oceniam dorobek naukowy mgr Barbary Pawłowskiej [Indeks Hirscha wg bazy Web of Science - 9, Scopus - 8; sumaryczny IF - 68,781; zgłoszenia patentowe; krajowe 5, zagraniczne 4; uzyskane patenty 2; udział w 1 projekcie badawczym; kierowanie projektami w ramach badań statutowych dla młodych naukowców UJD w Częstochowie – 7; 4 Nagrody Rektora za szczególne osiągnięcia w pracy].

Wniosek końcowy

Recenzowaną rozprawę doktorską Pani mgr Barbary Pawłowskiej pt. „Reakcja siewek jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.) na obecność cieczy jonowych w glebie” oceniam bardzo pozytywnie, zarówno pod względem merytorycznym, jak i formalny. Wnosi ona nowe elementy poznawcze i uytylitarne i w pełni zasługuje na wysoce pozytywną ocenę. Rozprawa

została napisana profesjonalnym językiem, a cel pracy został zrealizowany poprawnie zgodnie z metodologią nauk empirycznych. Doktorantka prawidłowo sformułowała zadanie naukowe oraz prawidłowo zinterpretowała uzyskane wyniki w oparciu o literaturę. Koncepcja rozprawy, przyjęte metody, sposób ich realizacji pozwalają stwierdzić, że Doktorantką posiada duży zasób wiedzy teoretycznej i specjalistycznej. Zakres i treść dysertacji kwalifikują ją do dyscypliny naukowej *agronomia*.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone Ustawą z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz.595 z późn. zm.) oraz Rozporządzenia MNiSW z dnia 19 stycznia 2018 i w związku z tym wnioskuję o dopuszczenia Pani mgr Barbary Pawłowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie z uwagi na bardzo trafny i aktualny temat pracy, szeroki zakres badań, walory merytoryczne i użytkowe wnioskuję o jej wyróżnienie.

dr hab. inż. Joanna Lemanowicz, prof. uczelni

