

Dr hab. Maria Drapikowska, prof. UPP

Poznań, 30 października 2024 r.

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Katedra Ekologii i Ochrony Środowiska

61-691 Poznań, ul. Piątkowska 94C

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Mai Sędzik-Wójcikowskiej

**Zastosowanie substancji biologicznie czynnych celem ograniczenia toksyczności ołowiu  
w roślinie**

**1. Wprowadzenie**

Niniejszą ocenę pracy doktorskiej opracowałam w odpowiedzi na pismo Przewodniczącej Rady Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka, Pani dr hab. inż. Joanny Podlasińskiej, prof. ZUT, skierowane w dniu 11 września 2024 roku, w którym to dokumencie zostałam wskazana przez Radę Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka jako recenzent w przewodzie doktorskim Pani mgr inż. Mai Sędzik-Wójcikowskiej.

Promotorem pracy jest Pani dr hab. inż. Beata Smolik, prof. ZUT.

**Podstawa prawna:** art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789) oraz rozporządzeniu MNiSW z dnia 19 stycznia 2018 roku w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. z 2018 r. poz. 261), zgodnie z art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. – Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669).

Metale ciężkie wchodząc w obieg materii przemieszczają się w łańcuchu troficznym, powodując stres na wszystkich jego poziomach. Przedstawiona do recenzji praca koncentruje się na roślinach uprawnych, które dzięki produkowanej ogromnej biomase są rezerwuarem tych zanieczyszczeń. Zanieczyszczenie środowiska związkami ołowiu stanowi poważne zagrożenie i ogromne konsekwencje dla organizmów, a działanie toksyczne tych metali wynika z ich trwałości w środowisku oraz zdolności akumulacji w tkankach.

## **2. Formalna ocena rozprawy**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska składa się z cyklu czterech wieloautorskich publikacji opublikowanych w latach 2015-2024. Trzy z nich posiadają współczynnik wpływu, a ich sumaryczna wartość wynosi 5,7, natomiast łączna liczba punktów za wszystkie publikacje cyklu, według klasyfikacji MNiSW wynosi 280 pkt. Doktorantka jest pierwszym autorem w trzech publikacjach, a jej indywidualny wkład w poszczególnych pracach oceniono na 45%-60%. Polegał on zarówno na opracowaniu koncepcji pracy, planowaniu i realizacji badań, jak i interpretacji wyników i przygotowaniu manuskryptu. Dokumentacja przedstawiona do oceny zawiera papierowe wersje artykułów oraz opracowanie podsumowujące przedstawione w nich rezultaty, na które składa się 10 rozdziałów: streszczenie, wstęp, cel badań, materiał i metody, omówienie wyników badań, wnioski, literatura, streszczenie, kopie artykułów wchodzących w zakres rozprawy oraz oświadczenia o udziale Autorów w formułowaniu koncepcji badawczej, planowaniu i prowadzeniu badań.

W opracowaniu podsumowującym cykl publikacji Pani magister przedstawiła problematykę badawczą, dokonując przeglądu wyników prac innych autorów w dostępnej literaturze. Autorka wyznaczyła główny cel badawczy jakim było cyt. „ograniczenie toksyczności stresu spowodowanego  $Pb(NO_3)_2$  poprzez egzogenne zastosowanie substancji biologicznie czynnych.”

W ramach rozprawy doktorskiej w latach 2014-2016 przeprowadzono cztery niezależne doświadczenia, które pozwoliły na realizację postawionych szczegółowych celów badawczych. Cel pracy, materiał badawczy, sposób prowadzenia doświadczeń i procesów technologicznych, zastosowane metody analityczne i statystyczne są prawidłowe i nie budzą zastrzeżeń. Na podkreślenie zasługuje bardzo precyzyjne przedstawienie szczegółowych zadań i zakresu planowanych doświadczeń oraz ich prawidłowa realizacja, co w konsekwencji doprowadziło wyjaśnienia stawianych pytań. Świadczy to o dobrym przygotowaniu mgr Mai Sędzik-Wójcikowskiej do prowadzenia prac naukowych i bardzo dobrym opanowaniu metod i technik badawczych.

## **3. Merytoryczna ocena pracy**

Rozprawa doktorska została przygotowana w oparciu o oryginalne wyniki uzyskane w warunkach kontrolowanych doświadczeń w komorze fitotronowej, *in vitro* i w warunkach szklarniowych.

Doktorantka wyznaczyła cel nadrzędny badań jakim było cyt.: „ograniczenie toksyczności stresu spowodowanego przez  $Pb(NO_3)_2$  poprzez egzogenne zastosowanie substancji biologicznie czynnych”. Kolejno, wyznaczono cele szczegółowe; a mianowicie: cyt.”1. Wybór gatunku rośliny uznanej za wrażliwą na podstawie zmierzonych parametrów morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych 10-dniowych siewek różnych gatunków roślin uprawnych. 2. Wybór substancji biologicznie czynnej, która w największym stopniu niweluje toksyczny wpływ ołowiu na parametry morfologiczne, biochemiczne i fizjologiczne w liściach 10 dniowego jęczmienia jarego odmiany Eunova, uznanego za gatunek wrażliwy na ołów. 3. Egzogenne zastosowanie witaminy PP w celu zmniejszenia stresu wywołanego przez  $Pb(NO_3)_2$  w roślinie wrażliwej, w doświadczeniu laboratoryjnym. 4. Egzogenne zastosowanie witaminy PP w celu zmniejszenia stresu wywołanego przez  $Pb(NO_3)_2$  w roślinie wrażliwej, w doświadczeniu laboratoryjnym”.

**Publikacja nr 1:** „Effect of lead on germination and some morphological and physiological parameters of 10-day-old seedlings of various plant species”.

W pracy przedstawiono wyniki doświadczenia prowadzonego w warunkach kontrolowanych w fitotronie, na siewkach dwunastu gatunków roślin (dyni zwyczajnej *Cucurbita pepo* var. Danka Polka, rzodkwi zwyczajnej *Raphanus sativus* var. Carmen, ogórka siewnego *Cucumis sativus* L., jęczmienia zwyczajnego *Hordeum vulgare* var. Eunova, żyta zwyczajnego *Secale cereale* var. Bojko, pszenicy zwyczajnej *Triticum aestivum* var. Bryza, łubinu wąskolistnego *Lupinus angustifolius* var. Caro, słonecznika zwyczajnego *Helianthus annuus* L., pomidora zwyczajnego *Lycopersicon esculentum* var. Faworyt, lucerny siewnej *Medicago sativa* L., pieprzycy siewnej (rzeżuchy) *Lepidium sativum* L. oraz soczewicy jadalnej *Lens culinaris* Medik.). Celem eksperymentu było zbadanie fitotoksyczności wywołanej azotanem ołowiu  $Pb(NO_3)_2$ . Wykazano toksyczny wpływ  $Pb(NO_3)_2$  na kiełkowanie nasion, wzrost korzeni, wzrost siewek i suchą masę, zawartość barwników asymilacyjnych oraz stwierdzono podwyższone stężenie proliny u wszystkich badanych gatunków roślin w odniesieniu do kontroli. Spośród taksonów poddanych eksperymentowi, trzy nich, a mianowicie dynia zwyczajna, żyto zwyczajne i pszenica zwyczajna wykazały tolerancję na ołów. Najbardziej wrażliwe na obecność ołowiu okazały się: jęczmień jary, pomidor zwyczajny, lucerna siewna



i rzodkiew zwyczajna. Reasumując wyniki Autorka do kolejnego etapu badań wybrała jęczmień jary (*Hordeum vulgare*).

**Publikacja nr 2:** "Effect of nicotinamide in alleviating stress caused by lead in spring barley seedling".

W doświadczeniu, sadzonki *Hordeum vulgare* zostały poddane działaniu  $Pb(NO_3)_2$  z jednoczesnym zastosowaniem wybranych związków łagodzących toksyczność ołowiu (kwasu askorbinowego, glutationu, nikotynamidu,  $\alpha$ -tokoferolu i kwasu salicylowego). Zastosowanie kombinacji substancji biologicznie czynnych z solą ołowiu spowodowało zmniejszenie toksycznego wpływu jonów ołowiu na kształtowanie się parametrów morfologicznych siewek jęczmienia zwyczajnego. Najlepszy efekt uzyskano po zastosowaniu amidu kwasu nikotynowego (wit. PP), wpłynął on łagodząco na hamowanie długości korzeni i siewek oraz świeżej masy sadzonek, ponadto po jego aplikacji stwierdzono obniżenie zawartości markerów stresu min. MDA oraz obniżenie zawartości enzymów CAT i POX.

**Publikacja nr 3:** "The Effect of Use of the Biologically Active Substances in Alleviating the Stress Caused by Lead in Barley Seedling on the Basis of Biochemical and Physiological Parameters".

W eksperymencie aplikowano zarówno różne stężenia  $Pb(NO_3)_2$ , jak i stężenia witaminy PP, stosując w/w związki w różnych kombinacjach, co pozwoliło na szczegółową analizę odpowiedzi morfologicznej i fizjologicznej rośliny na stres wywołany zróżnicowanymi dawkami obu związków. Zbadano zdolność kiełkowania, długość i masę siewek, zawartość chlorofilu i karotenoidów oraz markery stresu – zawartość proliny, MDA oraz aktywność enzymów CAT i POX.

Praca potwierdziła indukowanie przez związki ołowiu wielu zaburzeń metabolicznych u testowanego gatunku, a zastosowanie nikotynamidu w dawkach 50 i 100  $\mu M$ , jako przeciwutleniacza wpłynęło korzystnie na wzrost, rozwój i parametry biochemiczne *Hordeum vulgare* w kulturze *in vitro*.

**Publikacja nr 4:** „Effect of Application Methods of Nicotinamide on the Alleviation of Lead-Induced Stress in Spring Barley”.

Eksperymentalnie stwierdzono, że 1 mM  $Pb(NO_3)_2$  spowodował zmniejszenie długości korzeni i pędów oraz wzrost aktywności katalazy i peroksydazy, a także zawartości MDA, proliny i barwników asymilacyjnych w badanych fazach rozwojowych jęczmienia jarego.

Witamina PP miała istotny i korzystny wpływ na badane parametry morfologiczne, biochemiczne i fizjologiczne, zmniejszając tym samym toksyczność soli ołowiu. Najlepszy efekt w ograniczaniu stresu ołowiowego osiągnięto poprzez opryskiwanie dolistne oraz podlewanie siewek roztworem witaminy PP.

Podsumowując, prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej przedstawiają materiał faktograficzny, ograniczony do zagadnień merytorycznych, niezbędnych dla przeprowadzenia przez Autorkę prawidłowego wniosku. Poszczególne publikacje ściśle zazębiają się i stanowią logiczną całość, co ułatwia ich studiowanie i merytoryczną ocenę.

W artykułach zgromadzono bogatą bibliografię, cytowaną we właściwy sposób. Pozytywnie oceniam również to, że w piśmiennictwie Autorka wykorzystwała niektóre pozycje starsze, co oznacza, że sięgnęła do prac źródłowych, będących cennymi oryginalnymi osiągnięciami naukowymi, a nie ograniczyła się do cytowania pozycji na podstawie zawartego w nich przeglądu literatury lub dyskusji, jak to się zdarza w licznych publikacjach. Merytorycznie oceniam niniejszą rozprawę bardzo wysoko.

Szczególnym osiągnięciem według mnie, była bardzo wnikliwa analiza odpowiedzi fizjologicznej badanych roślin na stres wywołany solami ołowiu, Do szczególnie wartościowych i w dużej mierze oryginalnych osiągnięć Doktorantki należy zaliczyć zbadanie wpływu jednocześnie kilku substancji biologicznie czynnych niwelujących skutki działania ołowiu i wyznaczenie jednego najskuteczniejszego związku jakim okazał się nikotynamid. Ponadto uzyskane wyniki mogą mieć duże znaczenie praktyczne dla ochrony roślin uprawnych przed skutkami działania metali ciężkich w środowisku.

### **Uwagi ogólne**

1. Brak dyskusji wyników w autoreferacie Doktorantki jest według mnie niedopatrzeniem. Co prawda, Pani Magister sformułowała prawidłowe wnioski, podążając za wyznaczonymi celami badań, jednak podjęty temat badawczy był bardzo złożony, a zadania badawcze stanowiły oddzielne publikacje, stad rodzi się konieczność powiązania wyników poszczególnych etapów i ich przedyskutowania z literaturą przedmiotu. Oczekiwałam również, aby w autoreferacie postawiono hipotezy badawcze, które powinny być nieodłącznym elementem pracy doktorskiej.
2. W pracy skupiono się na odpowiedzi fizjologicznej na stres wywołany solami ołowiu oraz na wyborze substancji biologicznie czynnych dających najlepsze efekty w łagodzeniu negatywnych jego skutków. W wyniku badań wybrano rośliny wrażliwe i niewrażliwe na

działanie soli ołowiu. Według mnie sprawdzenie intensywności poziomu akumulacji Pb w roślinach oraz transportu tego pierwiastka z gleby do korzeni i części nadziemnej roślin, przy pomocy współczynników np. translokacji i bioakumulacji, byłoby dopełnieniem uzyskanych wyników.

### **Uwagi szczegółowe**

#### **Publikacja nr 1**

Analizując wyniki odpowiedzi fizjologicznej i morfologicznej, Doktorantka wyznaczyła gatunki najbardziej wrażliwe na obecność ołowiu, a mianowicie: jęczmień jary, pomidor zwyczajny, lucerna siewna i rzodkiew zwyczajna.

Interesuje mnie dlaczego do kolejnych szczegółowych badań Autorka wybrała tylko jęczmień jary (*Hordeum vulgare*) pomimo tego, że pozostałe wrażliwe gatunki znacznie silniej zareagowały na stres, biorąc pod uwagę chociażby indeks tolerancji (Ti) obliczony np. dla pomidora zwyczajnego (Ti=10,26), czy lucerny siewnej (Ti=15,24).

#### **Publikacja nr 2**

Autorka po zastosowaniu kombinacji substancji biologicznie czynnych stwierdziła, że amid kwasu nikotynowego (PP),  $\alpha$ -tokoferol i glutation miały największy wpływ na łagodzenie stresu wywołanego przez jony ołowiu u jęczmienia zwyczajnego.

Moje wątpliwości budzi jednak wynik analizy skupień przedstawiony na rycinie (Fig. 1), na której nie znalazłam kombinacji Pb/PP? A interpretacja wyników przedstawionych na Fig 2 jest niemożliwa ze względu na nieczytelny obraz.

Ponadto, podążając za wynikami uzyskanymi w omawianym artykule, nie jest dla mnie jasne dlaczego do dalszych eksperymentów wytypowano tylko nikotynamid?

#### **Publikacja nr 3**

Pomiar poziomu wolnej proliny jest stosowany w kontrolowanych doświadczeniach do oceny różnic w reakcjach roślin na stres wywołany jednym czynnikiem. Zgodnie z cytowaną literaturą, stres wywołany solami metali ciężkich powoduje obniżenie zawartości proliny w komórkach. Niejasne są dla mnie w związku z powyższym, stwierdzenia w opisie wyników cyt.:” Stwierdzono istotny wzrost zawartości proliny (1,41  $\mu\text{mol g}^{-1}$  ś.m. rośliny) przy zastosowaniu 2,0 mM  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  w porównaniu do kontroli (1,04  $\mu\text{mol g}^{-1}$  ś. m. rośliny)” i kolejne: „Warunki stresu metalami ciężkimi istotnie obniżyły poziom proliny w 10-dniowych siewach jęczmienia (0,55 – 0,96  $\mu\text{mol g}^{-1}$  ś. m. rośliny)”. Moje pytanie brzmi: czy poziom proliny się zwiększył czy zmniejszył? A może na początku się zwiększył, ponieważ jak wiadomo z literatury, początkowy stres obniża katabolizm proliny, co skutkuje jej



gromadzeniem się w komórkach, a potem zmniejszył, tworząc kompleksy z jonami ołowiu i oddziałując z innymi cząsteczkami sygnałowymi?

#### **Publikacja nr 4**

W posumowaniu wyników eksperymentu, zarówno w autoreferacie jak i w publikacji Autorka stwierdziła, że ilość chlorofilu i karotenoidów wzrosła po zastosowaniu soli ołowiu; cyt. „Zastosowanie w doświadczeniu 1 mM Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> spowodowało zmniejszenie długości korzeni i pędów oraz wzrost aktywności katalazy i peroksydazy, a także zawartości dialdehydu malonowego, proliny i barwników asymilacyjnych w badanych fazach rozwojowych jęczmienia jarego odmiany Eunova.” Według mnie wniosek ten nie wynika z otrzymanych w pracy rezultatów, w których dowiedziono, że po zastosowaniu soli ołowiu nastąpił spodziewany spadek zawartości barwników, w tym chlorofilu, a ich wzrost nastąpił po zastosowaniu egzogennej witaminy PP.

#### **4. Podsumowanie**

Powyższe uwagi krytyczne nie umniejszają faktu, że recenzowana rozprawa doktorska pt.: "Zastosowanie substancji biologicznie czynnych celem ograniczenia toksyczności ołowiu w roślinie" prezentuje wysoki poziom merytoryczny oraz spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim oraz wymogi określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789) oraz w rozporządzeniu MNiSW z dnia 19 stycznia 2018 roku w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. z 2018 r. poz. 261), zgodnie z art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. – Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669). W związku z tym, przedstawiam Radzie Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Mai Sędzik-Wójcikowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Marie Duerikhu*