

dr hab. Robert Biczak, prof. UJD

Częstochowa, dn. 31.08.2023 r.

Uniwersytet Jana Długosza w Częstochowie

Wydział Nauk Ścisłych, Przyrodniczych i Technicznych

Katedra Biochemii, Biotechnologii i Ekotoksykologii

Al. Armii Krajowej 13/15

42-200 Częstochowa

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Justyny Pelc

**pt.: Zastosowanie kwasu askorbinowego celem ograniczenia toksyczności
związków fluoru w glebie i w roślinie**

Recenzja została przygotowana w odpowiedzi na pismo Pani dr hab. inż. Joanny Podlasińskiej, prof. ZUT, Przewodniczącej Rady Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka, Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Przesłana do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Justyny Pelc została wykonana na Wydziale Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Promotorem rozprawy jest Pani dr hab. inż. Beata Smolik, prof. ZUT, zatrudniona w Katedrze Bioinżynierii tegoż wydziału, a Promotorem pomocniczym Pani dr inż. Martyna Śnioszek.

Oceniana rozprawa doktorska dotyczy bardzo interesujących i ważnych naukowo zagadnień związanych z możliwością zanieczyszczenia środowiska przez szkodliwe związki fluoru. Pierwiastek ten jest sklasyfikowany na piątym miejscu w hierarchii trucizn środowiskowych, ponieważ charakteryzuje się wysoką toksycznością. Takie oddziaływanie dotyczy głównie roślin, a większość prac naukowych traktujących o oddziaływaniu związków fluoru na rośliny dowodzi ich wysokiej fitotoksyczności. Negatywne oddziaływanie fluoru na rośliny związane jest z indukowaniem stresu oksydacyjnego w komórkach tych organizmów, co z kolei powoduje degradację kwasów nukleinowych, białek, czy peroksydację lipidów. Jeżeli dochodzi również do degradacji i obniżenia się zawartości barwników fotosyntetycznych to następuje wówczas obniżenie produkcji pierwotnej, a obserwowane spadki plonów roślin uprawnych sięgają niekiedy 50%. W związku z powyższym niezwykle ważne jest

poszukiwanie i opracowanie takich metod, które skutecznie ograniczą toksyczne oddziaływanie związków fluoru na rośliny np. poprzez zwiększenie ich odporności. Bardzo skuteczną metodą jest np. hodowla odmian roślin charakteryzujących się zwiększoną odpornością na fluor, jednak jest to metoda długotrwała. Dlatego trwają poszukiwania innych metod zaradczych, które w sposób szybki będą niwelować bądź ograniczać negatywne skutki obecności związków fluoru w środowisku glebowym, w którym uprawiane są rośliny. Jedną z takich metod, charakteryzująca się wysokim potencjałem praktycznym, polega na egzogennym wykorzystaniu związków naturalnie występujących w roślinach o wysokim potencjale antyoksydacyjnym. Do takich substancji można zaliczyć kwas askorbinowy, który jest jednym z najbardziej efektywnych antyutleniaczy, dlatego egzogenne stosowanie kwasu askorbinowego może być prostym, a jednocześnie wydajnym sposobem radzenia ze szkodliwością związków fluoru dla roślin. Na chwilę obecną w literaturze naukowej brak jest informacji na temat wykorzystania antyoksydacyjnych właściwości kwasu L-askorbinowego w zapobieganiu, bądź ograniczaniu fitotoksyczności fluoru.

W te trendy wpisuje się rozprawa doktorska Pani mgr inż. Justyny Pelc. Podjęte i zrealizowane przez Doktorantkę badania, których celem było określenie odpowiedniej dawki i formy aplikacji kwasu L-askorbinowego, która w sposób jak najbardziej efektywny ograniczy wielkość tzw. stresu fluorowego u pszenicy, uważam za niezwykle aktualne i ważne naukowo, głównie w aspekcie możliwości wykorzystania rolniczego gleb zanieczyszczonych związkami fluoru.

Formalna ocena rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Justyny Pelc pt. „Zastosowanie kwasu askorbinowego celem ograniczenia toksyczności związków fluoru w glebie i w roślinie” została przygotowana w oparciu o oryginalne wyniki badań własnych. Rozprawa liczy 129 ponumerowanych stron i zgodnie z klasycznym układem prac doktorskich została podzielona na 10 głównych części. Są to: Streszczenie, Abstract, Wstęp, Cel i zakres badań, Przegląd literatury, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski i Bibliografia. Wykorzystana przy pisaniu pracy doktorskiej literatura obejmuje 189 pozycji, z czego 159 to pozycje anglojęzyczne. Jestem głęboko przekonany, że tak obszerna i profesjonalnie dobrana literatura na pewno była bardzo pomocna w napisaniu rozdziału – Przegląd literatury oraz w przygotowaniu prawidłowej i rzetelnej dyskusji wyników badań własnych Doktorantki. Praca doktorska zawiera 38 tabel i 11 rysunków prezentujących opracowane statystycznie

wyniki badań. Praca napisana jest językiem prostym, w miarę poprawnym stylistycznie, co bardzo ułatwia czytelnikowi zapoznanie się z zawartością ocenianej dysertacji.

Merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej

Rozpoczynając ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Justyny Pelc pod względem merytorycznym, należy na początku stwierdzić całkowitą zgodność treści pracy z jej tematem. Streszczenia pracy doktorskiej, zarówno w języku polskim, jak i angielskim, przedstawiają zaś najważniejsze informacje zawarte we wszystkich jej rozdziałach.

Kolejnym rozdziałem pracy jest Wstęp, w którym Autorka wprowadza czytelnika w problematykę podjętych badań, wskazując jak ważne znaczenie dla prawidłowej wegetacji roślin ma monitorowanie czynników biotycznych i abiotycznych, które mogą być przyczyną wystąpienia stresu oksydacyjnego. Do wyjątkowo szkodliwych substancji dla organizmów glebowych i roślin zalicza się związki fluoru, stąd konieczność poszukiwania metod niwelujących lub ograniczających toksyczne skutki występowania fluoru w środowisku. Z kolei Doktorantka precyzuje cel główny pracy: „Celem niniejszej pracy było ograniczenie toksyczności związków fluoru poprzez egzogenne zastosowanie kwasu L-askorbinowego”. Oprócz celu głównego Autorka sprecyzowała cztery cele szczegółowe, wskazujące m.in. na metody badawcze, dzięki którym powyższy cel główny został zrealizowany.

Brak jest natomiast jednoznacznie sformułowanej hipotezy badawczej.

Rozdział zatytułowany: Przegląd literatury, przygotowany i napisany w oparciu o obszerną fachową bibliografię składa się z siedmiu podrozdziałów: Naturalne i antropogeniczne źródła fluoru w środowisku, Toksyczność fluoru wobec roślin, Stres oksydacyjny wywołany fluorem oraz mechanizmy detoksykujące, Wybrane antyoksydanty enzymatyczne i nieenzymatyczne, Chlorofil a, b oraz karotenoidy – barwniki fotosyntetyczne, Prolina i dialdehyd malonowy – wskaźniki stresu oksydacyjnego oraz Aktywność enzymów glebowych – wskaźnik zanieczyszczenia gleb. W wymienionych podrozdziałach Doktorantka wymieniła i scharakteryzowała najważniejsze związki fluoru występujące w środowisku, przedstawiła mechanizm toksyczności fluoru dla roślin i skutki skażenia gleb tym pierwiastkiem oraz dokonała szczegółowej charakterystyki zagadnień związanych ze stresem oksydacyjnym. Ponadto w tej części rozprawy doktorskiej pokrótce scharakteryzowano podstawowe wskaźniki stresu oksydacyjnego oraz drobnocząsteczkowe naturalne antyoksydanty i enzymy, których zadaniem jest detoksykacja wolnych rodników tlenowych.

Realizacja założonego celu pracy doktorskiej wymagała od Autorki zaplanowania i przeprowadzenia badań. Badania zostały przeprowadzone w latach 2014-2017 i składały się

z 4 etapów. W etapie pierwszym dokonano oceny oddziaływania roztworu NaF o stężeniu 10 mM na 10 gatunków roślin: rzodkiewka zwyczajna, rzodkiew zwyczajna, jęczmień zwyczajny, żyto zwyczajne, pszenica zwyczajna, łubin wąskolistny, słonecznik zwyczajny, ogórek zwyczajny, lucerna siewna i pomidor zwyczajny. Na podstawie zmian wielkości wybranych parametrów biometrycznych, fizjologicznych i biochemicznych tj. długość siewek, długość korzeni, świeża masa, indeks kiełkowania, indeks tolerancyjności, zawartość chlorofilu i karotenoidów oraz poziom proliny, dialdehydu malonowego w 10-cio dniowych siewkach tych roślin, wyznaczono ich tolerancję na fluor i do dalszych badań wybrano jedną z roślin nietolerancyjnych – pszenicę zwyczajną odmiany „Bryza”. W etapie II określono możliwości łagodzenia stresu wywołanego zastosowaniem roztworu NaF w dwóch stężeniach 10 mM i 20 mM w 10-cio dniowych siewkach pszenicy zwyczajnej, poprzez egzogenne zastosowanie roztworów kwasu L-askorbinowego w trzech stężeniach: 0,5 mM, 1 mM i 2 mM. Reakcję siewek na zastosowane związki oceniono na podstawie pomiaru zmian wielkości tych samych parametrów, które były wykorzystane w etapie I. Etap trzeci to badania wazonowe, a analizy laboratoryjne wykonano w trzech terminach, tj. 14., 21., i 28 dniu od założenia doświadczenia. W etapie tym dokonano pomiarów fizjologicznych (zawartość chlorofilu i karotenoidów) i biochemicznych (zawartość wolnej proliny, MDA, kwasu askorbinowego oraz zmiany aktywności katalazy i peroksydazy gwajakolowej). Dodatkowo w tym etapie eksperymentu do badań wykorzystano również glebę, w której określono zmiany aktywności dehydrogenaz i fosfataz. W etapie III zastosowano jako czynnik stresogenny NaF w dwóch stężeniach: 25 mM i 50 mM, a wpływ kwasu L-askorbinowego badano dodając roztwory o stężeniu 1 mM i 2 mM. Natomiast etap IV to dwuletnie badania wazonowe, których celem było wyznaczenia najbardziej efektywnej formy aplikacji kwasu askorbinowego (moczenie nasion, oprysk roślin i podlewanie), zastosowanego w stężeniu 0,5 mM, podczas gdy fluorek sodu wykorzystano jako roztwór o stężeniu 50 mM. Badania laboratoryjne przeprowadzono w następujących fazach rozwojowych pszenicy: trzeciego liścia, krzewienia, strzelania w źdźbło i kłoszenia.

W rozdziale Materiały i metody znajduje się również szczegółowy i profesjonalny opis metodyki pobierania próbek do badań oraz opis właściwie dobranych i niebudzących żadnych zastrzeżeń merytorycznych metodyk analitycznych. Otrzymane wyniki badań poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu STATISTICA 10.0. Dane z trzech pomiarów analizowano przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji i testu t-studenta (etap I) oraz dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA (etap II, III i IV) i testu post-hoc Tukeya.

Najważniejszą częścią każdej rozprawy doktorskiej jest omówienie wyników badań i przeprowadzenie rzetelnej ich dyskusji z rezultatami uzyskanymi przez innych naukowców.

Prawidłowo zaplanowany eksperyment i starannie wykonane analizy zaskutkowały uzyskaniem wręcz olbrzymiej ilości wyników, które zostały zebrane w kilkudziesięciu tabelach oraz szczegółowo opisane na 63 stronach maszynopisu. Taki układ pozwolił na dokładne i zrozumiałe przedstawienie dużej ilości danych uzyskanych w ramach omawianego eksperymentu. Trzeba wyraźnie zaznaczyć, że analiza i interpretacja tak dużej ilości wyników na pewno nie była sprawą łatwą. Jednak i w tym przypadku należy stwierdzić, że Pani mgr inż. Justyna Pelc stanęła na wysokości zadania. Uzyskane wyniki badań wyraźnie wskazują, że zastosowane roztwory NaF charakteryzują się dużą fitotoksycznością dla pszenicy zwyczajnej oraz prowadzą do wystąpienia u tej rośliny jednoliściennej stresu oksydacyjnego. Szczególną wartością naukową mają jednak dane, dzięki którym Autorka udowodniła, że egzogenne zastosowanie naturalnego antyoksydanta jakim jest kwas L-askorbinowy może niwelować lub ograniczać nie tylko fitotoksyczność związków fluoru, ale również łagodzić skutki stresu oksydacyjnego. Nie bez znaczenia jest tutaj forma aplikacji kwasu L-askorbinowego, a z zastosowanych najefektywniejszą okazało się być podlewanie.

Po dogłębnej analizie treści rozdziału Dyskusja stwierdzam ponadto, że uzyskane wyniki badań własnych zostały przez Panią mgr inż. Justynę Pelc poddane bardzo wyczerpującej dyskusji z rezultatami uzyskanymi przez innych autorów.

Osiągnięte wyniki badań własnych pozwoliły Doktorantce na wyciągnięcie i poprawne sformułowanie sześciu wniosków, z których do najważniejszych zaliczam:

- Egzogenne zastosowanie kwasu L-askorbinowego obniża toksyczność wywołaną NaF u pszenicy w warunkach *in vitro*.
- Dogłębowo wprowadzony kwas L-askorbinowy obniża toksyczność wywołaną NaF u pszenicy w doświadczeniu wazonowym.
- Trzy formy aplikacji kwasu L-askorbinowego redukują toksyczność wywołaną przez NaF u pszenicy, a najefektywniejszą formą aplikacji jest podlewanie

Pomimo tych wszystkich walorów ocenianej dysertacji, z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na fakt, że Doktorantka nie ustrzegła się jednak pewnych niedociągnięć językowych i edytorskich, Niektóre z nich prezentuję poniżej:

str. 8 jest „parametry fizjologicznych”, winno być „parametry fizjologiczne”

str. 13 jest „wpływu zastosowanie”, winno być „wpływu zastosowania”

str. 14 jest „fluorki, który”, winno być „fluorki, które”

str. 18 jest „toksyczność na fluor”, winno być „toksyczność fluoru”

str. 22 jest „iskodliwy”, winno być „i szkodliwy”

- str. 29 jest „dobry wskaźniki”, winno być „dobry wskaźnik”
- str. 45 jest „w gatunkach”, winno być „u gatunków”
- str. 63 jest „wzrost endogennego stężenia kwasu”, winno być „wzrost stężenia endogennego kwasu”
- str. 65 jest „aktywność peroksydazy...17,03 g⁻¹·ś.m.·min⁻¹”, winno być „aktywność peroksydazy...17,03 μM H₂O₂ g⁻¹·ś.m.·min⁻¹”
- str. 69 w tytule tabeli 20 jest „Aktywność fosfatazy zasadowej i kwaśniej w glebie”, winno być „Aktywność fosfatazy zasadowej w glebie”
- str. 71 jest „aktywność”, winno być „aktywność”
- str. 99 jest „zawartość”, winno być „zawartość”
- str. 107 jest „w liściach odmiany pszenicy ozimej”, winno być „w liściach pszenicy ozimej odmiany”
- str. 107 jest „aktywność POX charakteryzowała się wzrostem aktywności wraz ze zwiększającym się stężeniem NaF w pożywce”, winno być „aktywność POX wzrastała wraz ze zwiększaniem stężenia NaF w pożywce”
- str. 111 jest „trzy formy aplikacji 0,5 mM kwasu L-askorbinowego redukuje”, winno być „trzy formy aplikacji 0,5 mM kwasu L-askorbinowego redukują”
- str. 76, 77, 80, 84, 87, 90, 94, 95, 98, 100, 102, w tytułach podrozdziałów i tytułach tabel pojawia się zwrot: „synteza średnich zawartości...”, albo „synteza średnich aktywności...”. Wydaję się, że wystarczyło napisać „średnia zawartość” lub „średnia aktywność”.

Powyższe uwagi nie wpływają jednak na całościową, pozytywną ocenę recenzowanej pracy doktorskiej. Podczas czytania ocenianej dysertacji nasunęły mi się jednak dwie kwestie, które wymagają wyjaśnienia:

1. Na podstawie wyników badań uzyskanych w etapie I, doktorantka uznała, że pięć gatunków roślin tj. pszenica, rzodkiewka, lucerna, słonecznik i pomidor są nietolerancyjne na fluor. Do kolejnych etapów wybrano pszenicę zwyczajną, ale na kartach rozprawy nigdzie nie znalazłem wyjaśnienia co było powodem takiego wyboru?
2. Prosiłbym również o wyjaśnienie wyników badań z etapu pierwszego dotyczących określenia długości korzeni (Tab. 4 i Rys. 11). W tabeli 4 doktorantka umieściła wyniki wskazujące na brak istotnych różnic pomiędzy długością korzeni 10-cio dniowych siewek uprawianych w warunkach kontrolnych (woda destylowana) i w obecności roztworu NaF o stężeniu 10 mM dla rzodkwi, jęczmienia, żyta i lubinu wąskolistnego. Na rysunku 11.2,

11.3, 11.4 i 11.6 widać natomiast wyraźne różnice w długości korzeni pomiędzy kontrolą, a obiektami z dodatkiem roztworu NaF dla wymienionych powyżej roślin. Skąd te rozbieżności?

Wnioski końcowe

Reasumując, w podsumowaniu stwierdzam, że nie mam żadnych wątpliwości co do faktu, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Justyny Pelc pt.: „Zastosowanie kwasu askorbinowego celem ograniczenia toksyczności związków fluoru w glebie i w roślinie” jest pracą nowatorską i stanowi samodzielne oraz oryginalne rozwiązanie prezentowanego w niej problemu naukowego. Koncepcja rozprawy, zastosowane metody badawcze, uzyskane wyniki i ich interpretacja pozwalają stwierdzić, że cel pracy został osiągnięty.

W związku z powyższym przedstawiona dysertacja spełnia ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim – Ustawa z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, w zw. z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, wnioskuje o dopuszczenie Pani mgr inż. Justyny Pelc do dalszych etapów procedury ubiegania się o stopień naukowy doktora.

dr hab. Robert Biczak, prof. UJD

