

prof. dr hab. Robert Biczak
Uniwersytet Jana Długosza w Częstochowie
Wydział Nauk Ścisłych, Przyrodniczych i Technicznych
Katedra Biochemii, Biotechnologii i Ekotoksykologii
Al. Armii Krajowej 13/15
42-200 Częstochowa

Częstochowa, dn. 29.10.2024 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Mai Sędzik-Wójcikowskiej
**pt.: Zastosowanie substancji biologicznie czynnych celem ograniczenia
toksyczności ołowiu 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. Mai Sędzik-Wójcikowskiej została wykonana na Wydziale Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, a promotorem rozprawy jest Pani dr hab. inż. Beata Smolik, prof. ZUT.

Poddana ocenie rozprawa doktorska dotyczy bardzo interesujących, a jednocześnie ważnych naukowo zagadnień związanych z możliwością wykorzystania substancji aktywnych biologicznie do redukcji toksycznego oddziaływania ołowiu dla jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.). Wszystkie gatunki roślin ze względu na brak możliwości przemieszczania się, a tym samym unikania sytuacji niekorzystnych dla swojego wzrostu i rozwoju, przez cały okres wegetacji poddawane są różnym rodzajom stresów środowiskowych, do których zalicza się również obecność metali ciężkich w glebie. Jednym z najbardziej toksycznych metali ciężkich jest ołów, a do najczęstszych źródeł decydujących o obecności tego metalu w środowisku glebowym, zalicza się przemysł (produkcja akumulatorów kwasowo-olowiowych, benzyn, farb, pestycydów, nawozów fosforowych itp.) oraz huty ołowiu, spalarnie śmieci i ścieków czy ścieki przemysłowe. Ekspozycja roślin na ołów widoczna jest w postaci hamowania wzrostu, redukcji plonu, a także wpływa na rozwój roślin poprzez zmianę wielu procesów

fizjologicznych i biochemicznych. Inną konsekwencją obecności ołowiu w środowisku wzrostu roślin jest stres oksydacyjny, co prowadzić może do peroksydacji lipidów, białek i uszkodzenia kwasów nukleinowych. Powyższe zaburzenia wzrostu i rozwoju roślin stanowią poważny problem, który w dużej mierze może doprowadzić do zmniejszenia plonu zbóż stanowiących podstawę światowych dostaw żywności. Z tego względu od wielu lat prowadzone są badania mające na celu złagodzenie stresu wywołanego metalami ciężkimi u roślin, a do substancji biologicznie czynnych, wykorzystanych w tego typu eksperymentach należą: auksyny, cytokiny, witaminy czy chelaty organiczne.

W tą tematykę badawczą wpisuje się rozprawa doktorska Pani mgr inż. Mai Sędzik-Wójcikowskiej. Podjęte i zrealizowane przez Doktorantkę badania, których celem było ograniczenie toksyczności i wielkości stresu oksydacyjnego u jęczmienia jarego, uprawianego na podłożu zawierającym sole ołowiu, poprzez zastosowanie substancji biologicznie czynnych, uważam za ważne naukowo, głównie w aspekcie możliwości ochrony upraw zbóż przed toksycznym działaniem jonów tego metalu.

Formalna ocena rozprawy doktorskiej

Pani mgr inż. Maja Sędzik-Wójcikowska jako rozprawę doktorską, zgodnie z art. 15 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z późniejszymi zmianami, przedstawiła zbiór 4 publikacji naukowych, któremu nadano tytuł „Zastosowanie substancji biologicznie czynnych celem ograniczenia toksyczności ołowiu w roślinie”. Rozprawa doktorska została zaprezentowana w następujących publikacjach:

1. **Sędzik M.**, Smolik B., Krupa-Małkiewicz M.: Effect of lead on germination and some morphological and physiological parameters of 10-day-old seedlings of various plant species. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych*, 2015, 26(3), 22-27. (40 pkt MNiSW)
2. **Sędzik-Wójcikowska M.**, Smolik B., Krupa-Małkiewicz M.: Effect of nicotinamide in alleviating stress caused by lead in spring barley seedling. *Journal of Elementology*, 2019, 24(1), 281-291. (IF = 0,8; 70 pkt MNiSW)
3. **Sędzik-Wójcikowska M.**, Krupa-Małkiewicz M., Smolik B.: 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. *Journal of Ecological Engineering*, 2023, 24(8), 198-208. (IF = 1,3; 70 pkt MNiSW)

4. Smolik B., **Sędzik-Wójcikowska M.**: Effect of application methods of nicotinamide on the alleviation of lead-induced stress in spring barley. *Agronomy*, 2024, 1314. (IF = 3,3; 100 pkt MNiSW)

Wszystkie prace zostały opublikowane w latach 2015-2024 w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, o współczynniku IF wahającym się od 0,8 do 3,3. Łączny współczynnik oddziaływania (IF) tego cyklu publikacji wynosi 5,4, a liczba punktów wg obowiązującej oceny czasopism dokonanej przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego jest równa 280 (dane z października b.r.). Wszystkie publikacje są współautorskie, a w trzech z nich współautorem oprócz Doktorantki i Promotorki jest także inny pracownik badawczo-dydaktyczny Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, Pani dr hab. inż. Marcelina Krupa-Małkiewicz, prof. ZUT. W trzech pracach stanowiących zbiór publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej, mgr inż. Maja Sędzik-Wójcikowska jest pierwszym autorem. Do dokumentacji dołączone zostały oświadczenia współautorów o ich udziale merytorycznym i procentowym w powstawaniu omawianych publikacji. Wynika z nich, że rola Doktorantki w powstawaniu tego zbioru prac stanowiących dysertację, polegała na współtworzeniu koncepcji badań, założeniu i prowadzeniu doświadczeń, wykonaniu analiz laboratoryjnych, a także opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników oraz współudziale w przygotowaniu publikacji i jej korekcie. Na podstawie dołączonych oświadczeń współautorów można stwierdzić, że procentowy udział Doktorantki w powstawaniu prezentowanych publikacji wynosił odpowiednio 60%, 60%, 55% i 45%.

Rozprawa liczy sobie 77 ponumerowanych stron, na których oprócz załączonych publikacji Pani mgr inż. Maja Sędzik-Wójcikowska zamieściła Wstęp, Cel badań, Materiały i metody badań, Omówienie wyników badań, Wnioski, Literatura, Streszczenie, Abstract, oraz Pisemne oświadczenia współautorów publikacji naukowych stanowiących rozprawę doktorską. Wszystkie te rozdziały zostały napisane prostym językiem, w miarę poprawnym stylistycznie co bardzo ułatwia czytelnikowi zapoznanie się z zawartością ocenianej dysertacji.

Merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej

Poddając ocenie rozprawę doktorską Pani mgr inż. Mai Sędzik-Wójcikowskiej pod względem merytorycznym, należy stwierdzić fakt, że treść pracy jest adekwatna do jej tematu, natomiast zamieszczone streszczenia, zarówno w języku polskim, jak i angielskim, przedstawiają skrótowo zakres informacji zawartych w pozostałych jej rozdziałach.

Kolejnym rozdziałem pracy jest Wstęp, w którym Autorka wprowadza czytelnika w problematykę podjętych badań, wskazując jak ważne znaczenie dla prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin mają czynniki biotyczne i abiotyczne będące przyczyną wystąpienia stresu oksydacyjnego u tych organizmów. Do wyjątkowo szkodliwych substancji dla roślin zalicza się metale ciężkie, a ołów jest drugim najbardziej toksycznym metalem ciężkim w środowisku. W związku z faktem, że zanieczyszczenie gleby ołowiem stanowi poważny problem nie tylko dla środowiska, ale również dla jakości plonu roślin uprawnych, koniecznym jest poszukiwanie metod ograniczających toksyczne skutki występowania ołowiu w środowisku, gdzie uprawiane są m.in. zboża, co z kolei powinno mieć pozytywny wpływ na tzw. bezpieczeństwo żywności.

Z kolei Doktorantka precyzuje cel badań: „Celem naukowym pracy doktorskiej było ograniczenie toksyczności stresu spowodowanego $Pb(NO_3)_2$ poprzez egzogenne zastosowanie substancji biologicznie czynnych”. Oprócz celu głównego Autorka sprecyzowała cztery cele szczegółowe, dzięki którym powyższy cel główny został zrealizowany:

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. Wybór najbardziej efektywnej metody stosowania substancji biologicznie czynnej zapobiegającej stresowi wywołanemu przez Pb w roślinie wrażliwej, w dwuletnim doświadczeniu wazonowym.

Brak jest natomiast jednoznacznie sformułowanej hipotezy badawczej.

Metodyka badań zaprezentowana w pracach naukowych składających się na rozprawę doktorską Pani mgr inż. Mai Sędzik-Wójcikowskiej pod względem merytorycznym nie budzi żadnych zastrzeżeń. Doktorantka w poddanej ocenie dysertacji, w rozdziale Materiały i metody badań, również szczegółowo opisała przeprowadzone badania, które zostały wcześniej z uwagą zaplanowane, alby mogły posłużyć do realizacji założonego celu rozprawy doktorskiej. Badania zostały przeprowadzone w latach 2014-2016 i składały się z 4 etapów, zrealizowanych w laboratoriach Katedry Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin oraz Katedry Bioinżynierii ZUT w Szczecinie. Rozdział ten zawiera także opis właściwie dobranych i ogólnie uznanych metodyk analitycznych, z których można wymienić metody pomiaru wskaźnika kiełkowania

(IG%) i wskaźnika tolerancji (TI), a także metodyki wykorzystane przy oznaczaniu zawartości barwników asymilacyjnych, wolnej proliny, dialdehydu malonowego oraz zmian aktywności peroksydazy i katalazy. Wszystkie otrzymane wyniki badań poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu STATISTICA 13.0., a istotność różnic określono za pomocą analizy wariancji i testu Tukey'a.

Najważniejszą częścią każdej rozprawy doktorskiej jest omówienie wyników badań i przeprowadzenie rzetelnej ich dyskusji z rezultatami uzyskanymi przez innych naukowców. W przypadku dysertacji, której podstawą jest jednotematyczny cykl publikacji, ocena merytoryczna otrzymanych wyników, przeprowadzonej dyskusji czy sformułowanych wniosków jest bardzo trudna. Związane jest to z faktem, że materiał zawarty w publikacjach był już niejednokrotnie recenzowany. Należy jednak stwierdzić, że poszczególne publikacje składające się na rozprawę doktorską Pani mgr inż. Mai Sędzik-Wójcikowskiej zostały starannie przygotowane i dostosowane do wymagań czasopism. Wysoko oceniam opracowanie tabelaryczne i graficzne otrzymanych wyników badań, co powoduje przejrzystość publikacji, a tym samym ułatwia prześledzenie ich wielowątkowości. Bardzo pozytywnie oceniam również wprowadzenie do dysertacji rozdziału Omówienie wyników badań. Ten swego rodzaju autoreferat jest bardzo pomocny w analizowaniu wyników badań własnych Doktorantki zaprezentowanych w cyklu publikacji stanowiących jej rozprawę doktorską.

Cykl publikacji składający się na pracę doktorską mgr inż. Mai Sędzik-Wójcikowskiej dokonuje niejako oceny możliwości wykorzystania substancji biologicznie czynnych w celu ograniczenia toksyczności ołowiu w roślinach. W pierwszym etapie badań określono oddziaływanie roztworu azotanu ołowiu (II) na kiełkowanie nasion, wzrost korzeni i siewek, zawartość świeżej i suchej masy, wskaźnik tolerancji oraz poziom barwników asymilacyjnych i wolnej proliny w roślinach ogórka, dyni, rzodkiewki, jęczmienia jarego, żyta zwyczajnego, pszenicy, łubinu niebieskiego, słonecznika, pomidora, lucerny, rzeżuchy zwyczajnej i soczewicy. Na podstawie zmian wielkości wybranych parametrów morfologicznych i fizjologicznych wyznaczono trzy gatunki wykazujące tolerancję na ołów (dynia, żyto i pszenica), a za najbardziej wrażliwe na obecność ołowiu w środowisku uznano jęczmień jary, pomidor, lucernę i rzodkiewkę (praca nr 1 – IOS-PIB, 2015). Do dalszych etapów badań wybrano jęczmień jary odmiany Eunova. Etap II prezentowanych badań wchodzących w skład ocenianej dysertacji objął eksperyment laboratoryjny, którego celem było określenie stopnia łagodzenia toksyczności jonów ołowiu dla siewek jęczmienia jarego poprzez egzogenne zastosowanie kwasu askorbinowego, glutationu, nikotynamidu, α -tokoferolu i kwasu salicylowego. W wyniku przeprowadzonych badań okazało się, że wszystkie te substancje

biologicznie czynne zmniejszały toksyczność ołowiu dla jęczmienia, a za najbardziej korzystne Doktorantka uznała zastosowanie w eksperymencie witaminy PP, witaminy E i glutationu (praca nr 3 – JEE, 2023). Do kolejnych etapów badań wybrano amid kwasu nikotynowego. Etap trzeci badań to doświadczenie laboratoryjne *in vitro*, w którym tolerancje na stres spowodowany ołowiem dla 10-cio dniowych siewek jęczmienia jarego, hodowanych na pożywce zawierającej 0,5-2,0 mM soli ołowiu oraz 25-100 μ M nikotynamidu oceniono poprzez pomiar wymienionych już wcześniej cech morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych. Łącznie wykorzystano w eksperymencie 16 kombinacji, a najlepszy efekt łagodzący toksyczność soli ołowiu zaobserwowano dla największych stężeń witaminy PP, równych 50 i 100 μ M (praca nr 2 – JE, 2019). Czwarty etap, dwuletnie doświadczenie wazonowe przeprowadzono w hali wegetacyjnej Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa ZUT w Szczecinie i dotyczyło ono określenia skutków łagodzenia toksyczności $Pb(NO_3)_2$ poprzez zastosowanie amidu kwasu nikotynowego w stężeniu 100 μ M w formie oprysku, moczenia ziarna i podlewania. W rezultatach wykazano, że najskuteczniejszą metodą stosowania witaminy PP było opryskiwanie dolistne i nawadnianie (praca nr 4 – Agronomy, 2024).

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

1. Spośród badanych substancji biologicznie czynnych najlepsze efekty w łagodzeniu negatywnych skutków stresu wywołanego 1 mM $Pb(NO_3)_2$ u jęczmienia jarego odmiany Eunova wykazały: witamina PP, α -tokoferol i glutation
2. Dawka 50 i 100 μ M witaminy PP zastosowana w doświadczeniu w kulturze *in vitro* przyniosła najlepsze rezultaty w zmniejszaniu szkodliwego oddziaływania ołowiu na jęczmień jary
3. Efekt zastosowanej dawki witaminy PP zależy od formy podania. Najlepszy efekt w ograniczaniu stresu ołowiowego daje oprysk dolistny i podlewanie witaminą PP

Generalnie, odnosząc się do całej rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Mai Sędzik-Wójcikowskiej należy stwierdzić, że stosunkowo trudno jest w tej pracy znaleźć słabe strony. Jednak z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na niewielkie niedociągnięcia językowe i edytorskie, w tym nieliczne tzw. „literówki”, które 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 za najbardziej wrażliwe gatunki roślin, na obecność ołowiu w środowisku, uznała jęczmień jary, pomidor, lucernę

- i rzodkiewkę, Do kolejnych etapów wybrano jęczmień jary odmiany Eunova, ale na kartach rozprawy nigdzie nie znalazłem wyjaśnienia co było powodem takiego wyboru?
2. W wyniku przeprowadzonego eksperymentu okazało się ponadto, że najbardziej korzystnie na łagodzenie efektów toksyczności ołowiu dla jęczmienia jarego oddziałują witamina PP, α -tokoferol i glutationu. Kolejne etapy prac badawczych objęły jednak tylko amid kwasu nikotynowego – co było powodem takiej decyzji?

Wnioski końcowe

Recenzowana praca doktorska Pani mgr inż. Mai Sędzik-Wójcikowskiej pt.: „Zastosowanie substancji biologicznie czynnych celem ograniczenia toksyczności ołowiu w roślinie”, nie budzi żadnych zastrzeżeń zarówno pod względem formalnym, jak i merytorycznym i jest samodzielnym oraz oryginalnym rozwiązaniem zaprezentowanego w niej problemu naukowego. Koncepcja rozprawy, zastosowane metody badawcze, sposób ich realizacji i interpretacja uzyskanych wyników 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, wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr inż. Mai Sędzik-Wójcikowskiej do dalszych etapów procedury ubiegania się o stopień naukowy doktora.

prof. dr hab. Robert Biczak

