

Dr hab. inż. Agnieszka Bartoszek
Politechnika Gdańska
Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii
Żywności
ul. Narutowicza 11/12
80-952 Gdańsk
tel: (+58) 347 17 23
fax: (+58) 347 22 48
e-mail: agnieszka.bartoszek@pg.gda.pl



Gdańsk, 20 października 2014

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr inż. Małgorzaty Borek

**pt. "Aktywność antyoksydacyjna liści kapusty białej na tle zmian fizjologicznych
i biochemicznych wywołanych skażeniem gleby cynkiem i kadmem"**

Zapewnienie odpowiedniego poziomu wyżywienia to problem, który towarzyszył ludzkości od zarania. Obecnie nie jest on mniej palący, szczególnie w obliczu gwałtownie rosnącej liczby ludzi zamieszkujących Ziemię przy kurczącym się areale terenów nadających się pod uprawę roślin jadalnych i na cele hodowlane. Obok poszukiwania wysokowydajnych metod produkcji rolnej, znaczenia nabiera właściwa gospodarka istniejącymi zasobami. Jednym z kierunków działań w tym względzie jest przywrócenie rolnictwu gleb zanieczyszczonych w wyniku industrializacji i chemizacji środowiska. Poszukiwane są ekonomiczne, skuteczne metody usuwania zanieczyszczeń środowiskowych zyskujące przy tym aprobatę społeczną. Do takich metod wydają się należeć technologie fitoremediacyjne wykorzystujące rośliny charakteryzujące się zdolnością kumulowania i/lub neutralizowania substancji uciążliwych dla środowiska, takich jak toksyczne metale ciężkie czy liczne substancje organiczne pochodzenia przemysłowego oraz stosowane np. w ochronie upraw. Skuteczność fitoremediacji jest uwarunkowana nie tylko zdolnością zastosowanych roślin do pobierania i kumulowania bądź neutralizowania zanieczyszczeń, ale także wydajnym przyrostem biomasy na terenach zanieczyszczonych. Od wielkości biomasy zależy bowiem wynos substancji niepożądanych z gleby. Znanych roślin, które spełniałyby wymagania stawiane użytecznym fitoremediatorom nie jest wiele, toteż nie ustają poszukiwania nowych. Recenzowana praca Pani mgr inż. Małgorzaty Borek wpisuje się w ten nurt sprawdzając fitoremediacyjną użyteczność kapusty białej głowiastej *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *alba* także od strony odporności na stres chemiczny.

Praca została wykonana w Katedrze Fizjologii Roślin przy Wydziale Rolniczo-Ekonomicznym Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie. Promotor pracy prof. dr hab. Marcin Rapacz i promotor pomocniczy dr hab. inż. Renata Bączek-Kwinta zajmują się fizjologią roślin od wielu lat i zdobyli w tej dziedzinie szerokie uznanie, dzięki czemu badania nad fitoremediacją mogły być powiązane z oceną stanu fizjologicznego i parametrami biochemicznymi istotnymi dla kondycji rośliny - fitoremediatora.

Celem pracy była ocena aktywności przeciwutleniającej liści kapusty białej głowiastej oraz stanu fizjologicznego w tym wydajności aparatu fotosyntetycznego roślin narażonych na podwyższone stężenie cynku i kadmu w glebie. Badania prowadzone były dla trzech odmian kapusty wzrastających w kontrolowanych warunkach w fitotronie na glebie o zadanej zawartości soli wymienionych pierwiastków.

Przedstawiona do recenzji rozprawa zawiera 145 stron maszynopisu. Na dysertację składają się następujące rozdziały: Wstęp, Cel badań, Przegląd literatury (4 podrozdziały), Materiał i metody z podziałem na część dotyczącą samej uprawy roślin kapusty (5 podrozdziałów) i opis stosowanych metod biochemicznych (5 podrozdziałów), Wyniki badań, Dyskusja wyników, Wnioski, na końcu umieszczona została lista cytowanych publikacji obejmująca 259 pozycji.

Dysertację rozpoczyna krótki Wstęp, w którym Doktorantka wychodzi od przedstawienia znaczenia reaktywnych form tlenu dla funkcjonowania komórek, po czym przechodzi do narażenia roślin na działanie metali w kontekście fitoremediacji. Zabrakło łącznika pomiędzy tymi tematami, którym jest fakt stymulacji stresu oksydacyjnego w komórkach, także roślinnych, wskutek narażenia na stres chemiczny, co zostało omówione w Przeglądzie literatury na stronach 25 i 44 oraz w przypadku narażenia na metale ciężkie wykazane w badaniach własnych Doktorantki. W tym miejscu chciałam zaznaczyć, że używane przez Doktorantkę określenie "stres metali" jest może krótkie, ale kłóci się z logiką języka polskiego. Lepiej więc go unikać na rzecz "narażenia na metale" lub "stresu chemicznego", bądź używać sformułowań bardziej opisowych, dłuższych, ale poprawnych merytorycznie i językowo.

Część rozprawy zatytułowana Przegląd literatury rzeczywiście zasługuje na takie miano, bowiem Doktorantka omawia w niej bardzo wiele wątków, od charakterystyki gatunku *Brassica oleracea* L., przez techniki fitoremediacyjne, po rolę cynku i kadmu w fizjologii roślin oraz mechanizmy odporności na metale. Bezsprzecznie wszystkie te wątki mają znaczenie dla przedmiotu rozprawy, ale może korzystniejszy by było pogłębione i wyczerpujące omówienie jednego z nich. Poruszenie tylu tematów na 43 stronach spowodowało bowiem, że z konieczności omówione zostały one dość pobieżnie. Pierwszym zagadnieniem poruszonym w tej części dysertacji jest charakterystyka roślin z rodziny kapustowatych, ze szczególnym naciskiem na kapusty określone jako warzywa kapustne. Jako niespecjalista w dziedzinie nomenklatury botanicznej chętnie dowiedziałabym się

w jakich sytuacjach należy używać nazwy kapustowate a w jakich kapustne? Ten fragment pracy napisany jest bardzo zwięźle, ale z dużym ładunkiem istotnych informacji. Mam tylko zastrzeżenia do ostatniego akapitu na str. 13. W literaturze światowej odchodzi się od zaliczania glukozynolanów do substancji “antyodżywczych”; to relikty przeszłości kiedy to nie zdawano sobie sprawy z prozdrowotnego działania tych związków. W świetle nowej wiedzy raczej należy je zaliczyć do “nieodżywczych” składników żywności. Produkty rozpadu glukozynolanów, takie jak izotiocyaniany i indole to substancje przeciwrakotwórcze o potwierdzonym działaniu w setkach badań. Takich dowodów w literaturze naukowej dla tiocyanianów i nitryli nie ma (str. 13). Kolejny omawiany temat to techniki fitoremediacyjne pokazujący zakres ich stosowalności oraz proponowane do wykorzystania rośliny. W jednym punkcie (str. 20 u góry) nieco trudno się zgodzić z tezą, że korzystnym działaniem jest przeprowadzenie rtęci w jej lotne pochodne uwalniane do atmosfery w wyniku fitoewaporacji (ten termin wydaje się poprawniejszy od fitowaloryzacji, który miałby odpowiadać angielskiemu określeniu phytovolatilization, czyli odparowanie, przeprowadzenie w stan lotny). Raczej uznałabym takie rozprzestrzenianie toksycznego metalu za ekologicznie niewskazane zgodnie z maksymą badaczy zajmujących się ochroną środowiska “dilution is not a solution to pollution”. Następnie Doktorantka omawia wielokierunkowy wpływ cynku i kadmu, a dokładniej ich jonów, na fizjologię roślin. Bardzo interesujące są także dane dotyczące zanieczyszczenia gleb tymi metalami w Polsce. Tu mam tylko uwagę co do niestety często spotykanego acz niefortunnego użycia określenia “koncentracja” (od ang. concentration) zamiast obowiązującego w polskim nazewnictwie chemicznym “stężenie”, ewentualnie “zawartość” (str. 24 oraz kilka innych miejsc w tekście). Na str. 32 nieprawidłowy jest zapis równania reakcji, w miejsce strzałki z dwoma ostrzami (oznaczenie zarezerwowane dla mezomerii), powinny być dwie przeciwnie skierowane równoległe strzałki wskazujące na odwracalny charakter reakcji. Końcowym, bardzo ciekawie napisanym, tematem Przeglądu literatury są spotykane u roślin strategie odporności na toksyczne metale. Tutaj też dwa drobne błędy się zakradły; na str. 38 wspomniano o cząsteczkach metali zawierających wysoce reaktywne grupy (chyba chodziło o cząsteczki kwasów organicznych), a na stronach 38/39 zgodnie z zastosowaną konwencją zamiast nazwy anionu - glutaminian - powinna być nazwa aminokwasu - glutamina.

Kolejny rozdział to Materiał i metody, w którym przedstawione są procedury zastosowane w trakcie prowadzenia upraw wazonowych kapusty oraz oznaczeń chemicznych i biochemicznych. Ten rozdział nie jest najlepiej napisany, szczególnie trudno by było powtórzyć analizy biochemiczne, które wykonano “na krążkach kapusty”, lepszym sformułowanie byłoby “dla próbek liści kapusty w postaci krążków” lub “dla krążków kapusty” w skrócie. Opisy metod nie zawierają szczegółów ważnych dla powtórzenia metody przez inną osobę. Nie wiadomo dlaczego pomiary spektrofotometryczne aktywności enzymatycznych prowadzono przez 2 minuty. Czy było to śledzenie kinetyki, czy pomiar

punktowy po upływie 2 minut. Na str. 64 (ostatnia linia) nagle pojawiają się nasiona jako próbka. Użyto też sformułowań żargonowych, np. zbuforowany roztwór (str. 64), mieszkanka cytochromowa (str. 63) i wyjątkową różnorodność sprzętu do głębokiego mrożenia: zamrażalka (str. 62), lodówka głębokiego mrożenia (str. 63), szafa głębokiego mrożenia (str. 65). Jakoś widocznie Doktorantka nie miała serca do pisania tej części dysertacji.

Muszę powiedzieć, że nie przypadł mi także do gustu podział omówienia uzyskanych wyników i ich dyskusji na dwa osobne rozdziały zatytułowane lakonicznie odpowiednio Wyniki badań i Dyskusja wyników. Domyślam się, że było to wzorowane na zaleceniach proponowanych przez niektóre redakcje czasopism naukowych, ale warto zauważyć, że i one zwykle oferują także opcję, w której przedstawienie wyników połączone jest z dyskusją. Ze względu na zwykle obszerny zakres rozpraw doktorskich ten ostatni sposób wydaje się znacznie lepiej sprawdzać. Czytając rozdział Wyniki badań brakowało mi jakiegoś ich sukcesywnego omówienia w kontekście innych wyników, a czytając Dyskusję wyników żałowałam, że nie ma ich obok tylko trzeba wertować pracę w ich poszukiwaniu. Nie ulega jednak wątpliwości, że wyniki opracowane są bardzo starannie i łatwo jest się wśród nich poruszać. Mam pytanie do oznaczeń aktywności enzymatycznych. Zwyczajowo aktywność enzymatyczną wyraża się w przeliczeniu na zawartość białka w próbce. W pracy podano także aktywność enzymatyczną w przeliczeniu na świeżą masę liścia. Który z tych sposobów zdaniem Doktorantki lepiej oddaje zależność pomiędzy stresem chemicznym a odpowiedzią rośliny?

W Dyskusji wyników podsumowane są uzyskane wyniki i przedstawione na tle doniesień literaturowych. Na podstawie zaobserwowanego zróżnicowania niektórych oznaczonych parametrów w zależności od odmiany kapusty oraz zawartości cynku i kadmu w glebie stwierdzono, że właśnie te parametry mogłyby być wykorzystane w ocenie kondycji fizjologicznej kapusty narażonej na stres chemiczny w postaci metali ciężkich (str. 112-115). Także aktywność enzymów zapewniających roślinom obronę antyoksydacyjną zdaniem Doktorantki jest dość zmienna w czasie i trudno jest zauważyć zdecydowany trend w relacji do poziomu stresu chemicznego. Nie jest to szczególnie zaskakujące, ponieważ jest to system indukowany i będzie szczególnie wrażliwy na zmiany zachodzące w otoczeniu i w roślinie. Dla dwóch punktów czasowych nie sposób prześledzić dynamikę i kierunek zmian aktywności antyoksydacyjnych, które mogą być zarówno stymulowane, jak i hamowane obecnością toksycznych substancji. Niewykluczone jednak, że aktywności składające się na barierę antyoksydacyjną kapusty narażonej na stres oksydacyjny skutek ekspozycji na metale ciężkie są addytywne. Być może byłoby interesującym spróbować nałożyć na siebie (graficznie zsumować) zmierzone wartości aktywności enzymatycznych (przeliczone na świeżą masę) i wówczas zdecydować czy takie podejście pozwoli lepiej przewidywać skuteczność bariery antyoksydacyjnej w warunkach stresu chemicznego.

Rozdział zawierający Wnioski skrótkowo podsumowuje stwierdzone zależności pomiędzy narażeniem na podwyższone stężenie cynku i kadmu a kondycją roślin kapusty. Wydaje się, że wniosek nr 1 zyskał niezamierzone znaczenie z powodu chochlika stylistycznego. Zabrakło mi w tych wnioskach ogólniejszego odniesienia do fitoremediacji, tzn. czy i które z oznaczonych parametrów wskazują na przydatność bądź nie kapusty jako fitoremediatora.

Przedstawiona praca jest bardzo starannie przygotowana pod względem redakcyjnym. Usterki redakcyjne są nieliczne i zapewne tylko ze względu na wieloletnie doświadczenie edytorskie udało mi się je zauważyć, a z obowiązku recenzenta muszę je przytoczyć:

- w spisie treści dwukrotnie pojawiła się strona nr 5 (rozdziały 4.3.1 - 5.4);
- str. 54, 2. akapit: jest ...”pojemność 50 lub 25 cm⁻³”..., powinno być cm³;
- str. 69, u góry: jest ...”1 mol KCl”..., powinno być ...”1 M KCl lub KCl (1 mol x dm⁻³)”...;
- str. 85, linia 2. od dołu: jest ...”roślinroślin”..., powinno być ...”roślin”...;
- str. 102, Ryc. 28: tytuł osi odciętych to “odmian”, a powinno być “odmiana”
- str. 105: jest ...”przetwory dla dzieci”..., powinno być ...”przetwory dla dzieci”...;
- str. 106: jest ...”roślinytej”..., powinno być ...”rośliny tej”.

Podsumowując, recenzowana praca zarówno pod względem koncepcji, wykorzystanego warsztatu badawczego, uzyskanych wyników dostarcza nowych informacji na temat reakcji roślin kapusty, a być może także innych kapustowatych, na stres abiotyczny. W szczególności praca dostarcza nowych danych co do zmian w funkcjonowaniu bariery antyoksydacyjnej w liściach kapusty w odpowiedzi na stres oksydacyjny stymulowany obecnością metali ciężkich. Na tej podstawie można wnioskować o odporności tej rośliny na zanieczyszczenia gleby metalami, a co za tym idzie o możliwości zastosowania kapusty w fitoremediacji.

Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa pt. “Aktywność antyoksydacyjna liści kapusty białej na tle zmian fizjologicznych i biochemicznych wywołanych skażeniem gleby cynkiem i kadmem” spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim przez Ustawę o Stopniach i Tytule Naukowym i przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Rolniczo-Ekonomicznego Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Małgorzaty Borek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A. Bartoń