

Warszawa, 29.05.2016

Prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz
Zakład Anatomii i Cytologii Roślin, IBEBR
Wydział Biologii; Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1; 02-096 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Kutrowskiej
pt: „Wspomagana fitoekstrakcja metali śladowych: Cu, Cd, Zn, Pb”
promotor: prof. dr hab. Barbary Tomaszewskiej
promotor pomocniczy: dr Arleta Małecka

1. Znaczenie podjętego tematu - uwagi ogólne:

W przedstawionej do oceny pracy doktorskiej poruszono ważny problem usuwania toksycznych metali ciężkich z gleby. Wobec braku optymalnych rozwiązań pomimo stale prowadzonych prac, pozostaje on ciągle aktualny. Główny temat badań to fitoekstrakcja metali z zanieczyszczonych gleb – najmniej inwazyjna dla środowiska technologia usuwania skażeń przy pomocy roślin. Z tego względu, wśród dostępnych metod usuwania zanieczyszczeń, pozostaje rozwiązaniem nad którym warto pracować by zwiększyć jej efektywność. Zatem podjęcie tego tematu uważam za uzasadnione.

2. Charakterystyka pracy i uzyskanych wyników

Rozprawa doktorska licząca 113 stron jest podzielona na sześć rozdziałów głównych, które poprzedzono Streszczeniem i Wykazem Skrótów oraz uzupełniono Spisem literatury, Suplementem (zawierającym spis stosowanych odczynników, tabele, wykresy i fotografie) oraz Wykazem tabel, rysunków i zdjęć.

We **wstępie** liczącym 18 stron przedstawiono główne zagadnienia dotyczące fitoekstrakcji: potrzeby stosowania tej metody do usuwania skażeń z gleby w odniesieniu do innych technologii remediacji, z przedstawieniem zalet i wad, ograniczeń, zakresu stosowania, uwarunkowań mających znaczenie dla podejmowania decyzji o sposobie ograniczenia oddziaływania zanieczyszczeń obecnych w glebie na organizmy. Omówiono dwa parametry ważne dla powodzenia fitoekstrakcji – poziom akumulacji metali i produkcję biomasy, z podaniem sposobów ich modyfikacji. Przedstawiono w skrócie zabiegi zwiększające wydajność fitoekstrakcji. W dwóch ostatnich podrozdziałach omówiono stosowane w fitoekstrakcji wspomaganej chelatory oraz mikroorganizmy. Są to rozdziały szczególnie ważne dla opisu badań wykonanych w ramach pracy doktorskiej, gdyż chelatory oraz mikroorganizmy były testowane w prowadzonych doświadczeniach pod kątem przydatności dla bardziej efektywnego usuwania metali z gleby. Opis jest zwięzły, wystarczający dla zrozumienia sensu prowadzonych badań. Temat jest niezwykle obszerny, konieczne było zatem stosowanie skrótów w opisach, aby wskazać na główne uwarunkowania procesu fitoekstrakcji. Autorka dokonała trafnego wyboru. Jednak w niektórych

przypadkach tekst staje się zbyt pobieżny lub niejasny w swoim przesłaniu. I tak, na str. 21 opis pobierania metal(loid)ów jest zbyt uproszczony z niejasnym określeniem „po wnikięciu do korzenia przez błonę komórkową epidermy lub endodermy”. Z kolei na str. 23 przy opisie stosowanie EDTA autorka używa określeń „mobilizacja” i „mobilność” metali nie wyjaśniając ich znaczenia. Nie wyjaśnia także, jakie jest powiązanie zatrzymywania Pb w korzeniach z 2-3-krotnie zwiększoną mobilnością. Kolejny przykład to ostatnie zdanie Wstępu (str. 27). Nie podano, jaki jest sens biologiczny „wykazywanej różnicy w poziomie ekspresji genów” (jakich genów? Jaki to ma związek z opisywanymi procesami?). W całości wątki omówione we Wstępie zostały dobrze podzielone tematycznie co daje prawidłowy obraz złożoności problematyki poruszonej w pracy doktorskiej.

Celem pracy było przetestowanie przydatności wybranych kombinacji związków chelatujących oraz mikroorganizmów dla zwiększenia wydajności fitoekstrakcji wspomaganej. Cel przedstawiono bardzo krótko, wymieniając w punktach pytania, na które szukano odpowiedzi. Nie podano jednak uzasadnienia dla wyboru właśnie tych czynników. W związku z tym, chciałam prosić mgr Kutrowską o szersze wyjaśnienie wskazujące na kryteria wyboru przyjętego układu eksperymentalnego.

Autorka zastosowała klasyczne podejście metodyczne do oceny przydatności wybranych wariantów wspomagania fitoekstrakcji. Badania przeprowadzono w dwóch częściach – pierwszej opartej o hodowle hydroponiczne oraz drugiej prowadzonej na glebie zanieczyszczonej pochodzącej ze stanowiska naturalnego (testy z zastosowaniem czynników wspomagających fitoekstrakcję). Oceniono zawartość metali w glebie i w częściach roślin, obliczono parametry niezbędne dla porównania analizowanych wariantów i zróżnicowanej odpowiedzi wybranych gatunków roślin (współczynnik akumulacji, współczynnik akumulacji pędu, współczynnik biokoncentracji). W oparciu o wysokość biomasy, zawartość chlorofilu, reaktywnych form tlenu (RFT), aktywności systemów antyoksydacyjnych określono poziom toksyczności stosowanych warunków dla roślin. Mierzono także aktywność mikrobiologiczną w glebie poprzez określanie aktywności dehydrogenaz. Oceniano całkowite stężenie metali w częściach roślin (metodą ICP-MS) jak również metodą półilościową (LA-ICP-MS) w wybranych miejscach łodyg, korzeni i liści. Do analizy danych zastosowano stosowne metody statystyczne.

Przeprowadzono wstępne testy stosując uprawy hydroponiczne dla wstępnej charakterystyki gorczycy pod względem odpowiedzi na metale podawane pojedynczo oraz w mieszaninach dwóch metali. Gleby poddawane fitoekstrakcji są zwykle zanieczyszczone co najmniej dwoma metalami, zatem znajomość reakcji roślin na mieszaniny metali ma znaczenie praktyczne przy podejmowaniu decyzji o przyszłym schemacie nasadzeń roślin. Określenie zależnych od rodzaju metali oddziaływań synergistycznych czy antagonistycznych (wpływających na pobieranie, akumulację i

dystrybucję metali w roślinie) jest ważne dla podejmowania decyzji o ewentualnym zastosowaniu danego gatunku do oczyszczania gleby o określonym składzie mineralnym metodą fitoekstrakcji. Ciekawym i ważnym wynikiem jest wskazanie stymulacji translokacji Pb do pędu w obecności jonów Zn. Chciałabym w tym miejscu, jako uzupełnienie Dyskusji, poprosić autorkę rozprawy o przedstawienie transporterów metali, których substratem może być jednocześnie zarówno Zn jak i Pb.

Ważnym wkładem drugiej części badań (uprawy glebowe) do rozwoju wiedzy na temat mechanizmów zwiększania efektywności fitoekstrakcji metali z gleb, było połączenie uprawy współrzędnej (równoległy wzrost kilku gatunków) ze stymulacją poprzez podawanie doglebowe związków chelatujących (intensyfikujących biodostępność metali w glebach, pobieranie przez rośliny i translokację do części nadziemnych) oraz preparatów mikrobiologicznych. Pomimo wielu badań prowadzonych w tym zakresie na świecie, ze względu na brak rozwiązań gotowych do zastosowania w każdych warunkach, istnieje konieczność poszukiwania nowych kombinacji roślin i warunków wspomagania fitoekstrakcji.

Głównym osiągnięciem pracy są nowe wskazania dla stosowania kombinacji systemów wspomagania fitoekstrakcji:

- Wykazanie dużego zróżnicowania odpowiedzi na inokulację PGPR (*Burkholderia phytofirmans*) badanych gatunków (u gorczycy poprawa parametrów ważnych dla fitoekstrakcji takich jak stężenie w pędach, wartość BCF, wysokość plonu oraz ilość metalu w tkankach - głównie dla Zn, w mniejszym stopniu Cd; negatywny wpływ na lucernę i kukurydzę); Nie zgadzam się ze stwierdzeniem na s. 54, że inokulacja PGPR podwyższyła dla większości wariantów zawartość metali w gorczycy; na Rys. 4.8 wyższe wartości widać jedynie dla Zn i w mniejszym stopniu dla Cd. Minusem jest brak statystycznej analizy istotności różnic pomiędzy wynikami. Poza tym na Ryc. 4.8; i 4.10, Tab. 4.9 i 4.11 nie podano w jakich warunkach hodowano rośliny – domyślnie tylko na glebie zanieczyszczonej?
- Wykazanie korzystnego wpływu obecności kukurydzy w nasadzeniach gorczycy przy równoczesnym zastosowaniu wszystkich form wspomagania fitoekstrakcji dla zwiększenia stężenia metali w pędach gorczycy (najsilniej Pb), a także wartości BCF; Podobnie – kukurydza rosnąc w obecności gorczycy akumuluje więcej Pb (także Cd, Zn i Cu) po zastosowaniu wszystkich form wspomagania fitoekstrakcji (w porównaniu z wariantem bez suplementacji). Wskazuje to m. in. na specyficzną modyfikację dostępności metali w ryzosferze w badanym podwójnym układzie.
- Wykazanie przydatności komercyjnie dostępnego konsorcjum mikroorganizmów dla zwiększenia wydajności fitoekstrakcji metali – przede wszystkim Pb i w mniejszym stopniu Cu. Wykazano, iż można je stosować w procesie fitoekstrakcji indukowanej jako zamiennik

związków chelatujących. Jest to szczególnie cenne odkrycie, biorąc pod uwagę powszechną dostępność preparatu, niewysoki koszt i nieinwazyjny dla środowiska system stosowania (zawiera ono mikroorganizmy występujące naturalnie w glebie, polecane w rolnictwie dla zwiększenia dostępności mikro- i makro-elementów oraz dla przyspieszenia kompostowania)

- Wykazanie szczególnej przydatności ramnolipidów oraz kwasu nitrylotrioctowego (NTA) i konsorcjum mikroorganizmów dla fitoekstrakcji Zn z zastosowaniem testowanych gatunków;
- Wykazanie szczególnej przydatności stosowania NTA oraz konsorcjum mikroorganizmów do fitoekstrakcji Pb i Cu z zastosowaniem testowanych gatunków;

Rozprawę kończy rozdział **DYSKUSJA**, w którym na 20 stronach omówiono najważniejsze osiągnięcia pracy, przedstawiając własne wyniki na tle bogatej literatury. Autorka trafnie komentuje zalety i wady zastosowanego systemu wspomagania fitoekstrakcji, wskazuje także na możliwe przyczyny dużego zróżnicowania odpowiedzi roślin na testowane warunki.

Uwagi dodatkowe: Praca nie jest wolna od pewnych uchybień:

- a) Dlaczego jako pożywkę kontrolną wybrano 100-krotnie rozcieńczoną pożywkę Hoaglanda? Czy tak niskie stężenie składników mineralnych pożywki jest układem optymalnym dla wzrostu badanych roślin?
- b) Dlaczego nie analizowano parametrów ważnych dla oceny efektywności fitoekstrakcji w hodowanych pojedynczo roślinach kukurydzy i lucerny? Minusem jest brak testów dla pojedynczych roślin kukurydzy i lucerny (stosowanych w hodowlach współrzędnych z gorczycą) pokazanych na wykresach Ryc. 4.8 i 4.10.
- c) Nie zastosowano, jako układu odniesienia do pożywki zawierającej wysokie stężenia dwóch metali, pożywki zawierającej jeden metal o stężeniu takim jak w układzie podwójnym.
- d) Opis wyników jest bardzo uproszczony, ograniczony do wskazań gdzie dany parametr uległ zmianie. Utrudnia to śledzenie rozumowania autorki pracy i kryterium podejmowania kolejnych doświadczeń. Wskazanie ich sensu biologicznego podano dopiero w Dyskusji.
- e) Termin „akumulacja” używany nieprecyzyjnie w tekście, autorka odnosi go zarówno do opisu wyniku porównania współczynników akumulacji jak też stężenia metalu.
- f) Tabela 4.6 – podano stężenie [mg/kg s.m.] a nie całkowitą zawartość ;
- g) Dystrybucja mikroelementów, s.50; Ryc.4.4 – nie opisano precyzyjnie co przedstawia, co oznacza poziom zmian pierwiastków w roślinach (jakie wartości dzielono przez siebie, nie podano co to jest „próba traktowana i próba kontrolna”); W legendzie brak informacji o gatunku rośliny;
- h) Interakcje pomiędzy metalami, s. 51: W zasadzie brak opisu wyników – zamieszczono jedno krótkie zdanie. Tab. 4.5, s.51 – brak informacji o gatunku rośliny;

Uwagi techniczne

- a) Wyniki podano w formie Tabel i Wykresów (nazwanych Rys.), dlaczego część z nich zamieszczono w tekście, część jednak na końcu rozprawy, nie podając przekierowania do tej części pracy. Taki układ utrudnia czytanie pracy i śledzenie wyników.
- b) Tab. 4.14, s.61: w górnym wierszu – „plon [mg]” – sugeruje suchą masę w mg, a nie zawartość metalu w zebranej biomase. Niejasność wprowadza także pierwsze zdanie w opisie Tabeli zamieszczonym pod spodem.
- c) Spis literatury – nieczytelny, bez formatowania tekstu;

Błędy edytorskie i językowe

literówki: s. 13, 16, 23, 65

Wysuchone s.43 (zamiast wysuszone)

s.48 – obecność Pb wpływała podwyższyła akumulację ... (wpływała nie zostało skreślone)

Transportery przez błonowe (s.20)

Komórki translokują ... (s.21)

Układ eksperymentacyjny – s. 23

„ładowanie ksylemu” – raczej „załadunek ksylemu ... s.21

s.50 – słowo „poziom” powtarza się w każdym zdaniu, a w jednym zdaniu nawet 2-krotnie.

Wykonano serie upraw badających (uprawy nie badają), s. n35

s. 67 – w wariacie traktowanym metalami (traktowane są rośliny, a nie wariant)

Wniosek końcowy:

Wymienione uwagi krytyczne nie umniejszają całokształtu osiągnięć. Dzięki poddaniu testom ciekawego systemu wspomagania fitoekstrakcji otrzymano nowe ważne wyniki, dające szansę na dalsze usprawnienie tej metody. Wyznaczają one także ścieżki dla dalszych badań. Stanowią zatem twórczy wkład w poznanie procesów wspomagających fitoekstrakcję metali. Autorka wykazała się umiarem w interpretacji nowych danych, nie prowadziła zbyt daleko idących spekulacji. Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca spełnia wymagania art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 . Nr 65, poz. 595; z późniejszymi zmianami.). W związku z tym wnoszę o jej przyjęcie, oraz o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Kutrowskiej do dalszych etapów , przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz