

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt.: „Wspomagana fitoekstrakcja metali śladowych: Cu, Cd, Zn, Pb” wykonanej przez mgr Agnieszkę Kutrowską w Zakładzie Biochemii Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

1. Wprowadzenie

Zmiany do jakich doszło w środowisku wskutek obecności i działalności gospodarczej człowieka okazały się tak istotne że zaczęto stawiać hipotezę rozpoczęcia nowej ery geologicznej zwanej Antropocenem (Levis i inni, Nature. 2015. 519: 171-180). Gatunek ludzki pochwalić się może szeregiem osiągnięć tak ich jak: poprawą warunków w jakich żyjemy, powszechnej edukacji i opiece zdrowotnej czego wskaźnikiem jest długość życia mieszkańców naszej planety. Niestety wiele tych osiągnięć uzyskano kosztem środowiska naturalnego co było o tyle łatwe że z wielu jego zasobów korzystano nie ponosząc żadnych kosztów, niestety ma to miejsce również obecnie. Pozyskane zasoby po ich wykorzystaniu przez człowieka wracają do środowiska ale jako opady produkcyjne powodując jego zanieczyszczenie. Wiele tych niekorzystnych zmian poczyniono zarówno wskutek grabieżczej jak i nieświadomej działalności człowieka w pewnym momencie zdano sobie jednak sprawę z zagrożenia i skali poczynionych szkód i podjęto procesy naprawcze. Jednym z pierwszych obszarów było zanieczyszczenie metalami ciężkimi, które były wykorzystywane od pierwszych etapów rozwoju naszej cywilizacji i nadal pełnią istotne funkcje w gospodarce i życiu codziennym *homo sapiens*.

2. Dane formalne o rozprawie

Praca liczy 113 stron, część graficzna łącznie z aneksem zawiera 29 rycin, 11 tabel oraz 5 fotografii które pozwalają na precyzyjne przeprowadzenie analiz i udokumentowanie stawianych hipotez. Wprawdzie przyjęty przez Autorkę system numeracji nie jest zwykle stosowany w publikacji naukowych i trudno się zgodzić na określenie rysunkiem zdjęcia satelitarnego miejsca skąd pobrano skażoną glebę. Bibliografia rozprawy liczy 179 pozycji literatury w języku angielski opublikowanych w ostatnich latach z wyjątkiem wybranych publikacji metodycznych. Sam układ rozprawy jest typowy dla opracowań z tego obszaru nauki. Objętości najważniejszych rozdziałów rozprawy wynoszą odpowiednio: streszczenie polskie i angielskie 2 strony, wstęp będący przeglądem literatury obejmuje 19 str., cel pracy oraz 4 cele szczegółowe przedstawione w formie pytań zawarte są na 1 stronie, materiały i metody zajmują 16 str., wyniki 17 str., dyskusja 19 str. oraz podsumowanie w formie

wniosków i perspektywy, które zawarte jest na 2 stronach Wstęp będący przeglądem literatury zawiera cztery podrozdziały charakteryzujące: badane metale ciężkie, technologię fitoekstrakcji, związki chelatujące jako czynniki wspomagające proces fitoekstrakcji oraz rozdział prezentujący próby wykorzystania mikroorganizmów do intensyfikacji procesu fitoekstrakcji.

3. Dane merytoryczne o rozprawie

Podjęte w rozprawie doktorskiej zagadnienia stanowią część prowadzonych od kilku lat badań podstawowych w Zakładzie Biochemii Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w zakresie fitoremediacji - działu biotechnologii środowiskowej. Miło mi zauważyć że rozprawa dotyczy biotechnologii obszaru nauki zawartego w nazwie Instytutu. Zasadniczym nurtem badawczym j przedstawionej rozprawy było eksperymentalne poszukiwanie metod intensyfikacji technologii fitoremediacji oraz na ile to możliwe wyjaśnienie mechanizmu tej zwiększonej wydajności. Autorka rozprawy opierając się na aktualnie dostępnej wiedzy o związkach chelatujących, biosurfaktantach, konsorcjach mikrobiologicznych oraz nowych wariantach uprawy postawiła sobie za cel poprawę wydajności technologii fitoekstrakcji metali ciężkich. Pierwsze realizowane zadanie dotyczyło uprawy hydroponicznej gorczycy sarepskiej i pobierania Cu, Zn, Cd, i Pb pojedynczo i obecności w roztworze dwóch pierwiastków jednocześnie (co zwykle ma miejsce). Kolejny eksperymenty i towarzyszące im analizy dotyczyły uprawy roślin na zanieczyszczonej metalami ciężkimi glebie w której dopuszczalny poziom Pb, Zn i Cd był kilkukrotnie przekroczony. Oceniano konieczność dodania do zanieczyszczonej gleby, żyznej gleby ogrodniczej dla uzyskania warunków umożliwiających wzrost roślin, inokulację bakteriami stymulującymi wzrost roślin, aplikację konsorcjum bakteryjnego zatrzymującego metale w formie nie aktywnej w komórkach oraz wydzielającego siderofory do ich pobrania. Rośliny uprawiano jako pojedyncze gatunki oraz współrzędnie, wykorzystując zalety takiej uprawy.

4. Ocena rozprawy

Problematyka podjęta w rozprawie wychodzi naprzeciw powszechnie prezentowanemu zapotrzebowaniu społecznemu na pomoc i rozwiązanie przez naukę problemów wykreowanych działalnością człowieka. Zarówno w sensie rozpoznania zagrożenia: toksycznością ostrą i chroniczną czy drogami wnikania. toksyn. Kolejne zwykle pytanie do specjalistów reprezentujących naukę i technologię dotyczy naprawy

zanieczyszczonego środowiska. Pytania takie ostatnio bywają coraz bardziej stanowcze gdyż dorosłe staje się pierwsze pokolenie, które od przedszkola było edukowane treściami dbałości o środowisko. Ta młoda część naszego społeczeństwa jest bardziej aktywna i ambitna i nie zadowala się wynikami ciągle praktykowanym w naszej nauce monitoringiem skażeń (obecnie prowadzą je już często specjalnie powołane do tego służby publiczne), pragną oni czynnego udziału w naprawie i dalszym najbliższym naturalnemu funkcjonowaniu środowiska. Przedstawiona do recenzji praca jest właśnie taką propozycją czynnej naprawy środowiska naturalnego, należy przy tym zaznaczyć, że dotyczy bardzo trudnego zadania, jakim jest usunięcie z środowiska nie ulegających degradacji metali ciężkich.

Tytuł rozprawy jest zgodny z jej treścią. Wstęp rozprawy kreśli nam obraz zanieczyszczenia środowiska metalami ciężkimi w Europie i w Polsce. W następnych podrozdziale prezentuje dział fitoremediacji zwany fitoekstrakcją, który jest wiodącym w usunięciu metali ciężkich z naszego otoczenia i stanowi główny obiekt dociekań naukowych niniejszej rozprawy. Ta część rozprawy zawiera ostatnie doniesienia literaturowe dotyczące wnikaniem, translokacją, akumulacją i unieczynnieniem metali ciężkich na terenie komórki. Doktorantka bardziej obszernie opisuje procesy wnikania i translokacji jako kluczowe procesy dla fitoekstrakcji. Charakteryzuje związki chelatujące metale zarówno pochodzenia syntetycznego jak i naturalnego. Istotnym elementem bibliografii zawartej w rozprawie jest końcowy podrozdział poświęcony interakcji pomiędzy mikroorganizmami i roślinami wyższymi w aspekcie intensyfikacji procesu fitoekstrakcji. Możliwość naturalnej intensyfikacji fitoekstrakcji przykuwa uwagę wielu naukowców, głównie za sprawą negatywnie ocenianej (przez zajmujących się ochroną środowiska) intensyfikacji fitoremediacji za pomocą dodatkowo wprowadzanych do środowiska środków chemicznych w tym również syntetycznych chelatów. W tej części rozprawy zabrakło ustosunkowania się do zastosowanych w doświadczeniu efektywnych mikroorganizmów, Literatura z tego zakresu nie jest zbyt obszerna ale Autorka mogła zamieścić krótkie informacje o koncepcji efektywnych mikroorganizmów i jej twórcy.

Rozdział materiały i metody jest dobrze opracowany. W mojej ocenie Autorka dokonała trafnego wyboru gatunków roślin do prowadzonych doświadczeń i prawidłowo poprowadziła uprawę roślin zarówno w hydroponice jak i w glebie z skażonego stanowiska. Rozwiązała problem uprawy roślin na glebie skażonej metalami co często bywa wyzwaniem samym w sobie. Wykazała się dużymi umiejętnościami w ocenie fitotoksyczności uprawianych roślin jak i opanowaniu warsztatu analitycznego np.: pomiaru reaktywnych form tlenu, poziomu aktywności enzymów antyoksydacyjnych czy wykonaniem przy

współpracy z Pracownią Analizy Spektroskopowej Pierwiastków na Wydziale Chemii, techniką ICP-MS analiz ilościowych zawartości metali w tkankach różnych organów rośliny. Uzyskane wyniki wspiera przeprowadzona analiza statystyczna, której znajomością wykazała się przy ich opracowaniu i interpretacji..

Rozdział wyniki prezentuje uzyskane dane w sposób bardzo czytelny za sprawą zarówno dobrze skonstruowanego podziału rozprawy, formy przedstawienia oraz ich opisu.. Pierwszy podrozdział wyników poświęcony jest uprawie hydroponicznej gorczycy sarepskiej jednego z gatunków najlepiej pobierającego metale ciężkie z podłoża. Tego typu badania aby uniknąć trudnej do określenia ilości pierwiastka zatrzymanego przez kompleks sorbcyjny gleby prowadzi się w uprawie hydroponicznej. Oceniano cztery najczęściej zanieczyszczające nasze środowisko metale: Cu, Zn, Cd i Pb zarówno pojedynczo jak i po dwa razem pamiętając że zwykle na stanowisku skażonym notujemy zwykle obecność więcej aniżeli jednego metalu ciężkiego. Autorka reakcje uprawianych roślin na badane metale ciężkie analizowała na podstawie kilku wybranych parametrów dobrze charakteryzujących wzrost i rozwój oraz reakcję na warunki stresowe. Poziomy tej tolerancji Autorka oceniała mierząc biomasę traktowanych roślin oraz przyżyciowymi pomiarami poziomu chlorofilu *a* i *b*. Odnotowano znaczące obniżenie poziomu chlorofilu *b* przede wszystkim w kombinacjach z Cu co wiąże się z zachwianiem homeostazy tego pierwiastka w roślinie a jest on obecny w wielu enzymach aparatu fotosyntetycznego. Przyjęte parametry oceny są trafne i umożliwiły dobre prześledzenie i udokumentowanie reakcji roślin na stres abiotyczny wywołany przez metale ciężkie. Na tym etapie cennym elementem rozprawy jest akumulacja metali ciężkich w tym szczególnie kiedy podane zostały po dwa jednocześnie co pozwoliło na prześledzenie konkurencji lub synergizmu występujący między nimi. Oczywiście najbardziej interesująca dla nas jest możliwość zwiększonej translokacji i akumulacji metali przy ich równoczesnej obecności. W przeprowadzonym eksperymencie odnotowano taki proces w obecności Zn + Pb. Uzyskany wynik jest cenny ze względu że znaczne obszary gdzie te pierwiastki w Polsce się wydobywa i przetwarza gdyż zanieczyszczone są zarówno Zn jak i Pb. W tej części badań jednym z bardziej odkrywczych elementów rozprawy było oznaczenie ilościowe techniką LA-ICP-MS dystrybucji Cd i Pb w przekrojach poprzecznych łodyg i korzeni, które ilościowo i wizualnie bardzo komunikatywnie prezentują zróżnicowanie w procesie translokacji i akumulacji tych dwóch toksycznych a zbędnych do życia roślinie metali.

Drugi podrozdział wyników dotyczy upraw glebowych gdzie prowadzono uprawę roślin pojedynczo i wspólnie na zanieczyszczonej metalami ciężkimi glebie z Piekar Śląskich oraz jako kontroli pozytywnej glebie ogrodniczej. Dla zapewnienia większej tolerancji roślin

na metale ciężkie przeprowadzono inokulację trzech ocenianych gatunków roślin: gorczycy sarepskiej, lucerny siewnej i kukurydzy zwyczajnej, ryzobakterią *Burkholderia phytofirmans* szczep PsJN promującą wzrost roślin. Pozytywny efekt uzyskano w przypadku samej gorczycy i gorczyca uprawianej współrzędnie z innymi gatunkami. Natomiast w lucernie i kukurydzy na inokulację *B. phytofirmans* obniżała zawartość metali. Trudno określić co było przyczyną należy jednak pamiętać iż konsorcjum gatunków ryzosfery otaczającej korzenie jest znacznie bardziej bogate aniżeli występujące w glebie i wykazuje pewną specyficzność gatunkową bardzo prawdopodobne że nie dopuściło do obecności *B. phytofirmans* w otoczeniu korzeni lucerny i kukurydzy.

Kolejnym ocenianym czynnikiem który mógłby intensyfikować pobieranie metali ciężkich były dwa związki chelatujące, syntetyczny kwas nitrylotrioctowy oraz biosurfaktant z grupy ramnolipidów. Związki chelatujące dodawane są do gleby w tzw. fitoekstrakcji indukowanej zwykle kilka dni przed zbiorem udostępniają bowiem często tak duże ilości metalu że rośliny wysyczone tym pierwiastkiem zamierają i powinny być zebrane zanim część materiału roślinnego opadnie na glebę. W wielu krajach fitoremediacja indukowana mimo jej dużej przydatności szczególnie dla fitoremediacji metali trudno pobieranych przez rośliny jak np. Pb. nie jest dopuszczona do praktyki z powodu możliwości łatwego wymycia kompleksu chelat - metal do wód gruntowych.

Interesującą propozycją badawczą podjętą w rozprawie była aplikacja konsorcjum mikroorganizmów dostępnych pod nazwą EmFarma Plus firmy Probiotics Polska. Konsorcjum efektywnych organizmów opracowane przez profesora Teruo Higa z Uniwersytetu Ryukyus na Okinawie a obecnie oferowane przez różne wytwórnie znalazło zastosowanie w szeregu obszarach rolnictwa i ochrony środowiska. Jest to zbiór około dziewięćdziesięciu gatunków bakterii i grzybów w tym zwykle około 20 gatunków jest dominujących. Siłą konsorcjum jest jego stabilność wynikająca z przyjętej koncepcji że produkt końcowy danego gatunku jest substratem dla innego co pozwala na utrzymanie się w środowisku przez znaczny okres czasu mimo konkurencji ze strony mikrobiomu danej gleby. Zastosowanie efektywnych mikroorganizmów razem z chelatami jest bardzo interesującym kierunkiem badań podjętych w rozprawie. Szereg gatunków wchodzących w skład konsorcjum wykazuje się silnym działaniem wspomagającym wzrost roślin czyli są PGPR (z ang. *plant growth promoting rhizobacteria*) czy z dużym prawdopodobieństwem związki chelatujące (a naturalne chelaty na pewno). Substratem dla pewnych gatunków zawartych w konsorcjum są również chelaty co znacznie skróci czas w trakcie obecności w środowisku glebowym kompleksu chelat-metal ciężki a tym samym ich wymycie do wód gruntowych.

Dla zwiększenia bezpieczeństwa konieczne jest uwzględnienie warunków pogodowych i wykonanie zabiegu kiedy prognoza pogodowa nie przewiduje wystąpienia opadów. O trafności podjętej w badaniach koncepcji świadczą uzyskane wyniki największej zawartości każdego z czterech pierwiastków w uprawie współrzędnej gorczycy i kukurydzy kiedy zastosowano chelat NTA lub ramnolipidy i konsorcjum mikroorganizmów EmFarma.

Dyskusja, jest ważnym elementem każdej rozprawy naukowej ze względu na konfrontację uzyskanych wyników z rezultatami uzyskanymi przez innych autorów. Autorka rozprawy zgromadziła większość opublikowanej literatury z zakresu fitoekstrakcji metali ciężkich stąd prowadzona dyskusja stosunkowo obszerna. W prowadzonej dyskusji w pełni zachowana jest poprawność metodyczna i logiczna, Autorka umiejętnie konfrontuje wyniki swoich badań z dostępnymi danymi literaturowymi. Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami innych autorów np.: dotyczące pobierania metali ciężkich przez roślin oraz roli związków chelatujących i uprawy współrzędnej. Miło mi podkreślić, iż w kilku przypadkach Autorka może się pochwalić własnymi oryginalnymi osiągnięciami, zarówno w postaci uzyskanych wyników jak i własnych rozwiązań metodycznych co już uprzednio zostało podkreślone.

Końcowym opisowym rozdziałem rozprawy jest podsumowanie, które wyciągnięte wnioski przedstawia w formie opisowej głównie z powodu równoczesnego wpływu wielu czynników na wspomaganie procesu fitoekstrakcji. Należy jednak podkreślić iż przedstawione wnioski mimo ich opisowego charakteru są sformułowane bardzo poprawnie. W podsumowaniu przedstawiono również perspektywę dalszego pogłębienia prowadzonych badań w tym również ich przeprowadzenia w warunkach polowych

Jak każde opracowanie, praca doktorska mgr Agnieszki Kutrowskiej nie jest wolna od pewnych nieścisłości i uchybień. Większość z nich wynika prawdopodobnie z pewnego pośpiechu a i braku konsekwencji np. w metodyce Autorka tytułuje podrozdział : Uprawa roślin (3.2.1.) a zawarty w nim daje podtytuł: Hodowla hydroponiczna (3.2.1.1.), który nie jest prawidłowym gdyż termin hodowla określa się proces w którym otrzymuje się nowe odmiany roślin lub rasy zwierząt jako efekt krzyżowania dającego nową kompozycją genów. Natomiast z bardziej ogólnych uwag odnotowuje brak w przeglądzie literatury jak już wspomniano uprzednio informacji o efektywnych mikroorganizmach. Natomiast pragnę podkreślić że rozpraw napisana jest starannie bardzo komunikatywnym językiem. Plusem tekstu rozprawy jest również brak typowych literowych. błędów komputerowych..

5. Konkluzja

W posumowaniu rozprawę doktorską mgr Agnieszki Kutrowskiej oceniam jako bardzo dobrą, jest bogato udokumentowanym zbiorem informacji o fitoremediacji metali ciężkich i najważniejsze wnosi szereg nowych informacji z zakresu uczynienia technologii fitoremediacji bardziej wydajną. Zgromadzone informacje, trafność wnioskowania oraz co uważam za bardzo ważne to uzyskane wyniki, które obok aspektu poznawczego mechanizmów czyniących rośliny bardziej wydajnymi fitoremediantami, wnosi szereg praktycznych informacji przydatnych dla rozwoju technologii fitoremediacji

Uważam, że praca stanowi oryginalny dorobek naukowy, sposób jej opracowania oraz duża swoboda poruszania się w przedstawionej tematyce badawczej pozwalają na stwierdzenie, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa w pełni odpowiada wymaganiom ustawy o stopniach i tytule naukowym i na jej podstawie wnioskuję do Rady Naukowej Wydziału Biologii, Uniwersytetu im A. Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Agnieszki Kutrowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Podjęcie się badań których celem jest intensyfikacja czy jak Autorka określiła w tytule pracy wspomaganie procesu fitoremediacji było znacznym wyzwaniem. Trafne zaproponowanie i wykonanie całego kompleksu badań rozwijających tą technologię upoważniają mnie do przekazu że Autorka ma swój udział w rozwoju dyscypliny jaką jest fitoremediaacja i pozwalają na postawienie wniosku do Szanownej Rady Wydziału o wyróżnienie rozprawy mgr Agnieszki Kutrowskiej.

Warszawa 30. 05. 2016



Prof. dr hab. Stanisław W. Gawroński