

Prof. dr hab. Lech Wojciech Szajdak
Instytut Środowiska Rolniczego i Leśnego
Polska Akademia Nauk
ul. Bukowska 19, 60-809 Poznań

Poznań, 2018-11-29.

Recenzja

Pracy doktorskiej Pani mgr inż. Magdaleny Dziągwy-Becker pt. „Profil wolnych aminokwasów *Stellaria media* (L.) Vill. i *Viola tricolor* L. jako wskaźnik reakcji na czynniki środowiskowe” wykonanej w Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa, Państwowym Instytucie Badawczym w Zakładzie Herbologii i Technik Uprawy Roli we Wrocławiu.

Zastosowanie nowoczesnych metod analizy instrumentalnej zmierzających do optymalizacji procesów ekstrakcji, wysokiej sprawności technik rozdzielczych, identyfikacji uzyskanych produktów oraz specyficzności oznaczeń ilościowych, doprowadziło do dynamicznego rozwoju chemii analitycznej, chemii fizjologicznej oraz biochemii. Metody te umożliwiły między innymi zidentyfikowanie oraz oznaczenie struktury wielu nowych związków chemicznych, poznanie procesów metabolicznych oraz pomogły w ustaleniu zależności między strukturą chemiczną związku a jego funkcją biologiczną oraz fizjologiczną.

Czynniki biotyczne i abiotyczne siedliska połączone są wzajemnymi zależnościami, które nawzajem się uzupełniają. Czynniki abiotyczne środowiska, wśród których można wymienić wilgotność powietrza i gleby, jej zasolenie, jonizację, zawartość substancji mineralnych i organicznych, nasłonecznienie, temperaturę, dostęp do światła decydują o intensywności procesów chemicznych i biochemicznych w glebach. Każdy z tych czynników środowiska ma pośredni lub bezpośredni wpływ na organizmy żywe danego siedliska. Ponadto struktura gleby, nasycenie tlenem czy intensywność opadów deszczu w dość znaczący sposób kształtują biotop i decydują przede wszystkim o liczebności gatunków organizmów i mikroorganizmów, ich kondycji, rozwoju, rozmnażaniu i funkcjonowaniu oraz uczestniczeniu w obiegu pierwiastków składających się na przemianę materii i energii.

Skład ilościowy i jakościowy substancji chemicznych i biochemicznych jest charakterystyczny dla danego organizmu, w tym i dla danej rośliny, będąc ukształtowanym w procesie ewolucji. Aminokwasy w organizmach wyższych, niższych, glebach, wodach powierzchniowych i gruntowych występują w dwóch frakcjach, jako wolne i związane w postaci białek nisko i wysokocząsteczkowych. Jednakże funkcja obu tych frakcji jest odmienna. Wolne aminokwasy, o stężeniach ok. 1000 razy mniejszych od związanych, są bardzo niestabilne i podlegają ciągłym zmianom, jednakże są one odpowiedzialne za efekt fizjologicznego działania. Natomiast niektóre frakcje białek okazały się na tyle stabilne, iż wykorzystano je w technice „aminostratigraphy” – stanowiącej uzupełnienie metody pozwalającej określić wiek gleby w oparciu o zawartość izotopu ^{14}C . Ponadto białka uczestniczą w rozpuszczaniu substancji chemicznych i biochemicznych, adsorpcji i wiązaniu wody, lepkości, żelowaniu, emulgowaniu, adsorpcji tłuszczu oraz jako związki powierzchniowo czynne w tworzeniu pian.

W procesie ewolucji dla danego gatunku zostały ukształtowane charakterystyczne procesy i mechanizmy przemian aminokwasów. Dlatego skład jakościowy i zawartość wolnych aminokwasów może stanowić wskaźnik różnicujący organizmy w tym i rośliny.

Z zainteresowaniem należy odnieść się do pracy doktorskiej Pani mgr inż. Magdaleny Dziągwy-Becker zmierzającej do wykorzystania prostych związków organicznych, jakimi są

aminokwasy we frakcji wolnej tych substancji, jako wskaźniki różnicujące gatunki chwastów w warunkach naturalnych tzn. niepoddanych stresom środowiska. Zastrzeżenie, co do oszacowania zawartości wolnych aminokwasów w badanych roślinach niepoddanych żadnym stresom środowiska jest istotnie z punktu śledzenia charakterystycznych dla danej rośliny związków biologicznie czynnych, jakimi są aminokwasy, będące substratami bądź produktami przemian nieprzerwanie zachodzącymi w roślinie i pozostającymi w równowadze termodynamicznej z formami związanymi aminokwasów w białkach. Natomiast warunki stresowe środowiska zaburzają prawidłowe procesy chemiczne i biochemiczne charakterystyczne dla danego organizmu, co może utrudniać ich właściwą ocenę.

Recenzowana praca doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Dziągwy-Becker pt. „Profil wolnych aminokwasów *Stellaria media* (L.) i *Viola tricolor* L. jako wskaźnik reakcji na czynniki środowiskowe” została przygotowana w oparciu o spójny zbiór pięciu artykułów opublikowanych w naukowych czasopismach recenzowanych, stosownie do wymogów Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. art. 13 (Dz. U. nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami).

Celem pracy było opracowanie ilościowej, szybkiej, dokładnej oraz powtarzalnej metody analitycznej pozwalającej na oznaczenie wolnych aminokwasów obok produktów rozkładu i metabolitów w materiale roślinnym oraz wykorzystanie uprzednio opracowanej metody do oznaczeń tych substancji w gatunkach chwastów – gwiazdnicy pospolitej (*Stellaria media*) i fiołku trójbarwnym (*Viola tricolor*) oraz fiołku polnym (*Viola arvensis*) występujących powszechnie na terenie Dolnego Śląska, w zależności od różnych, jednakże naturalnych warunków środowiska pozostających w stanie samoregulacji wewnętrznej i zewnętrznej, czyli homeostazy.

Przystępując do oceny pracy doktorskiej można stwierdzić, że opisy metod badawczych są przemyślane i jasno przedstawione. Taki poprawny sposób przedstawiania toków postępowania (niebędący jeszcze powszechny w tego typu pracach) przemawia za ich łatwą odtwarzalnością oraz powtarzalnością.

W przedstawionej do oceny pracy doktorskiej wiele wysiłków autorki zmierzało do dopracowania warunków przygotowania próbki służących oznaczeniom ilościowym, aby w ich trakcie nie następował rozkład materiału badawczego, co prowadziłoby do uzyskania niewłaściwych bądź wątpliwych rezultatów. Opis toku postępowania przedstawiono niezwykle starannie i z punktu podstaw i zasad i chemii analitycznej jest on najbardziej właściwy.

W celu oszacowania ewentualnych różnic w jakościowym zestawie aminokwasów w materiale badawczym zdecydowano na korzystanie z takich technik przygotowania próbek oraz metod rozdziału i detekcji spełniających te oczekiwania. Dla realizacji tego zamiaru wykorzystano zestaw EZ:fastTM do oznaczeń wolnych aminokwasów w świeżej masie roślinnej oraz chromatografię cieczową z analizatorem mas typu potrójny kwadrupol (LC-MS/MS). Tak opracowaną metodę poddano walidacji, w której uwzględniono dla każdego związku dobór przejść jonowych, krzywą kalibracji, precyzję, dokładność, limit detekcji i oznaczalności. Walidację metody oparto o wytyczne zawarte w stosownych dokumentach dotyczących walidacji metod oznaczeń pestycydów w próbkach pasz i pożywieniu oraz w szerszej gamie matryc i oznaczanych substancji a także ze wskazań, których realizacja pozwoliła na istotne podwyższenie wiarygodności stosowanej metody analitycznej, a tym samym uzyskanych rezultatów.

Takie warunki spełniała opracowana przez autorkę metoda, będąc szybką, powtarzalną i odpowiednio czułą, prowadząc do oznaczenia w trakcie 18 minut 19 aminokwasów, których zawartość okazała się zbliżona do stężeń występujących w warunkach naturalnych. Biorąc pod uwagę staranne przygotowanie próbki oraz dokonane oznaczenia należy przyjąć, że uzyskane wyniki są rzetelne i pozwalają na wyciągnięcie właściwych wniosków.

W literaturze naukowej dostępne są informacje o zawartości wolnych aminokwasów w jabłkach, warzywach oraz piwie w zależności od ich geograficznego pochodzenia. Ponadto dane literaturowe ujmują zależność stężenia wolnych aminokwasów w roślinach będących wynikiem czynników abiotycznych - stresu wodnego, zasolenia bądź użytego herbicydu. Również literatura podaje informacje na temat wpływu uprawy monokulturowej żyta i zmianowania na zawartość wolnych aminokwasów w glebie.

Zamiar oznaczenia puli wolnych aminokwasów w powszechnie występujących chwastach segetalnych w zależności od warunków glebowych należy powitać z zainteresowaniem. Tym bardziej, że te rośliny, jako wszechobecne w otaczającym nas środowisku i stanowią cenny surowiec dla zielarstwa, dzięki obecności związków biologicznie czynnych w tym alkaloidów, saponin, tanin, flawonoidów, anthrachinonów i ich pochodnych oraz glikozydów nasercowych. Dlatego z dużym prawdopodobieństwem można założyć, że zainteresowanie tymi roślinami w różnych aspektach będzie z pewnością wzrastać.

Istotne osiągnięcia autorki w przedstawionej pracy doktorskiej wyrażają się w:

1. Wykazaniu, iż dominującymi wolnymi aminokwasami w gwiazdnicy pospolitej są związki o charakterze kwaśnym oraz ich pochodne - glutamina, kwas glutaminowy oraz kwas asparaginowy. Natomiast we fiołku trójbarwnym i fiołku polnym przeważały aminokwasy obojętne - alanina i walina.
2. Stwierdzeniu, że sumaryczne zawartości wolnych aminokwasów we fiołku trójbarwnym i polnym były istotnie wyższe od oznaczonych w gwiazdnicy pospolitej.
3. Znalezieniu istotnej proporcjonalnie wyższej sumarycznej zawartości wolnych aminokwasów egzogennych w stosunku do endogennych we fiołku trójbarwnym i polnym w porównaniu do gwiazdnicy pospolitej. Tak znaczna sumaryczna zawartość wolnych aminokwasów egzogennych w obu badanych fiołkach może stanowić doskonale naturalne źródło dla prawidłowego żywienia, co w konsekwencji może doprowadzić do zbilansowania zdrowej diety człowieka.
4. Stwierdzeniu, że gwiazdnica pospolita zebrana z pola charakteryzowała się wyższą sumaryczną zawartością wolnych aminokwasów w porównaniu do rosnących w warunkach kontrolowanych komór klimatycznych.
5. Określeniu, iż sumaryczne ilości wolnych aminokwasów w gwiazdnicy pospolitej rosnącej w warunkach kontrolowanych komór klimatycznych były w zakresie od 6.1 do 11.7% niższe w porównaniu do oznaczonych w tej roślinie rosnącej na polu.
6. Wykazaniu, że komercyjne podłoże ogrodnicze zawierające torf i piasek w stosunku 2:1 i zawartości węgla organicznego wynoszące powyżej 20% znacząco wpłynęło na podwyższenie zawartości wolnych aminokwasów w gwiazdnicy pospolitej w porównaniu z pozostałymi glebami mineralnymi wykorzystanymi do badań w warunkach kontrolowanych komór klimatycznych.
7. Oznaczeniu najwyższej zawartości proliny w gwiazdnicy pospolitej rosnącej na kwaśnej glinie piaszczystej pola z miejscowości Okrzeszyce na Dolnym Śląsku. Ten fakt należy uznać za niekorzystny, ponieważ prolina w warunkach kwaśnych w obecności jonów azotynowych przekształca się w N-nitrozo pochodną o właściwościach kancerogennych, mutagennych i teratogennych.
8. Oszacowaniu najniższej zawartości tryptofanu w gwiazdnicy pospolitej zebranej z pola w porównaniu do rosnącej w warunkach kontrolowanych komór klimatycznych.
9. Stwierdzeniu, że dla tej rośliny rosnącej w warunkach kontrolowanych komór klimatycznych podwyższenie zawartości materii organicznej gleby znacząco przyczyniło się do obniżenia stężenia tryptofanu w roślinie. Tryptofan jest substratem do tworzenia fitohormonu - kwasu indolilo-3-octowego (IAA), który indukuje wzrost komórek

korzeniowych przy wytwarzaniu korzeni bocznych i przybyszowych, hamuje wzrost pędów bocznych i ułatwia wzrost pędu głównego, partycypuje w mechanizmie powodującym przyspieszenie wzrostu podłużnego komórek, stymuluje lub hamuje syntezą enzymów z grupy hydrolaz oraz oksydaz i uczestniczy w dojrzewaniu i starzeniu się tkanek i owoców zachodzącym po zbiorze. Zmniejszone zawartości tryptofanu mogą wskazywać na podwyższone zawartości kwasu indolilo-3-octowego utworzonego z tryptofanu w roślinie.

10. Wykazaniu, iż najwyższą procentową zawartość wolnych aminokwasów egzogennych oznaczono w gwiazdnicy pospolitej rosnącej na glebie z najwyższą ilością materii organicznej.
11. Określeniu, iż wyższa zawartość materii organicznej gleby lekko kwaśnej siedliska B w porównaniu do siedliska A przyczyniła się do wyższej o ok. 13% sumarycznej zawartości wolnych aminokwasów w fiołku trójbarwnym w porównaniu do uzyskanej z gleby siedliska A o właściwościach silnie kwaśnych.
12. Wyższa kwasowość gleby siedliska A niż siedliska B skutkowała 2.7-krotnym zwiększeniem sumarycznej zawartości aminokwasów egzogennych oraz 2.2-krotnym podwyższeniem zawartości proliny. Jednakże wyższa zawartość proliny we fiołku trójbarwnym uzyskanym z gleby kwaśnej nie jest korzystnym zjawiskiem w kontekście jej możliwości przekształcenia w N-nitrozo pochodną o właściwościach, jakie opisano w pkt 7 recenzji.
13. Stwierdzeniu, że skład jakościowy oznaczonych wolnych aminokwasów w obu badanych fiołkach jest zbliżony.
14. Dostępne dane fizykochemiczne gleb z Teodorowa, Zagródki, Zbytowa, Laskowic oraz Wrocławia nie pozwalają na wyciągnięcie wniosków przyczynowo skutkowych dotyczących oznaczonych wolnych aminokwasów we fiołku polnym.

W trakcie czytania pracy doktorskiej nasunęło mi się kilka uwag względnie sugestii, które pozwolę sobie poniżej przedstawić.

Sugerowałbym nie używać terminu azot mineralny oraz azot organiczny. Są to terminy niewłaściwe, gdyż azot jest jeden - występujący w układzie okresowym. Proponowałbym korzystać z terminu azot w związkach mineralnych oraz azot w substancjach organicznych, względnie zawartość azotu w związkach nieorganicznych i organicznych.

Powszechnie w tabelach autorka podaje wartości średnie dla oznaczonych związków. Proponowałbym przedstawienie przedziału ufności dla wartości średniej, co pozwoliłoby łatwo porównać czy dane wartości różnią się istotnie od siebie względnie czy się nie różnią.

Korzystanie z zasad symboliki stosowanej w Międzynarodowym Układzie Jednostek /SI/ jest równie ważne jak poprawne stosowanie jednostek tego układu. Do takich zasad należy unikanie podwielokrotności jednostek w mianowniku dowolnej wielkości złożonej. Stąd preferuje się oznaczenie mol L^{-1} , mmol L^{-1} , $\mu\text{mol L}^{-1}$ a nie mmol mL^{-1} oraz pmol mL^{-1} .

- Tabela 2 (praca w *Analytical Methods*, 2015, 7, 7574-7581);

- Tabela 1 $\text{mg (100 g soli)}^{-1}$ winno być mg kg^{-1} lub g kg^{-1} (praca w *Polish Journal of Agronomy*, 2016, 27, 32-37).

- to samo, co powyżej w Tabela 2 (praca w *Open Chemistry*, 2018, 16: 833-841).

Powszechnie przyjmuje się, że każdy torf stanowi panaceum dla rozwoju roślin. Jednakże dla rozwoju roślin zalecany jest torf wysoki. Niestety ta elementarna znajomość nie jest powszechna wśród producentów oraz sprzedawców podłoży komercyjnych. Dlatego często w podłożach komercyjnych można spotkać torf niski a nawet mursz, których właściwości dla rozwoju roślin są niskie. Dlatego przed korzystaniem z podłoży sugerowałbym sprawdzenie typu torfu oraz stopnia rozkładu.

Dla oceny gleb korzystano w pracy doktorskiej z parametrów fizykochemicznych jak pH, zawartość węgla organicznego, przyswajalnych form fosforu i potasu, skład granulometryczny oraz uziarnienia. Jednakże te ww. elementarne parametry opisują glebę w sposób bardzo ogólny w skali tzw. „makro”. W celu poznania procesów i mechanizmów glebowych, jakie są odpowiedzialne za kiełkowanie nasion oraz wzrost i rozwój badanych roślin w warunkach naturalnych należałoby rozważyć dokonanie oznaczeń parametrów opisujących glebę w skali tzw. „mikro”, czy na poziomie procesów i mechanizmów glebowych i ewentualne powiązać je z zawartością wolnych aminokwasów w roślinach.

Wymienione wyżej uwagi oraz sugestie nie umniejszają wartości rozprawy, która wnosi nowe informacje do poznania zawartości wolnych aminokwasów w gwieźdniczy pospolitej oraz fiołku trójbarwnym i fiołku polnym.

Praca została napisana łatwym do zrozumienia językiem. Cytując słowa Melchiora Wańkowicza prace cechuje „prostota i aktualność”. Prostota odnosi się do postawienia jasnej hipotezy, celów oraz realizacji pracy, a aktualność związana jest z procesami i mechanizmami powszechnie występującymi w otaczającym środowiska w warunkach naturalnych tzn. niepoddanych stresom i zagrożeniom etc.

Praca doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Dziągwy-Becker odpowiada wszystkim ustawowym i zwyczajowym warunkom stawianym pracom doktorskim, a równocześnie dowodzi, że Pani mgr inż. Magdalena Dziągwa-Becker potrafi rozwiązywać stawiane przed nią zadania analityczne oraz posiada mocno ugruntowane wiadomości teoretyczne a rezultaty swej pracy umie przedstawić w czytelnej dobrze udokumentowanej formie. Wobec powyższego stawiam wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Magdaleny Dziągwy-Becker do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto ze względu na znaczący wkład pracy oraz wartość naukową rezultatów wnioskuje o wyróżnienie dysertacji Pani mgr inż. Magdaleny Dziągwy-Becker.

