

Lublin, 24.06.2016 r.

Prof. dr hab. Aleksandra Badora

Katedra Chemii Rolnej i Środowiskowej,

Zakład Kształtowania Jakości i Standaryzacji Surowców Roślinnych

Wydział Agrobiotechnologii

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin

e-mail: aleksandra.badora@up.lublin.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Piotra Bulaka

**pt. Wpływ jonów glinu i ołowiu na wybrane parametry biochemiczne i wzrost pszenicy
zwyczajnej”**

1. Wprowadzenie

Zboża są podstawą żywienia ludzi i zwierząt na świecie i dostarczają organizmowi 2/3 ilości potrzebnego białka. W światowym spożyciu udział produktów zbożowych wynosi 47 procent, a artykułów pochodzenia zwierzęcego około 32 procent. W Polsce zbożem produkowanym w największych ilościach jest pszenica i zajmuje ona największą powierzchnię zasiewów. Dominującym gatunkiem jest pszenica zwyczajna. W jej uprawach około 70-75% powierzchni zajmują bardziej plenne odmiany ozime. Pozostałe 25-30% przypada na odmiany jare, które są mniej wydajne, ale mają większą wartość użytkową - mąka z nich otrzymywana charakteryzuje się wyższą wartością wypiekową.

Odczyn gleb na obszarze naszego kraju ma znaczący wpływ na produkcję rolniczą. Gleby lekkie, silnie zakwaszone stanowią w Polsce ponad 30% gruntów ornych, a łącznie z glebami kwaśnymi (pH 4,5 - 5,5) zajmują około 60% powierzchni. Głównymi mankamentami tych gleb są deficyty wody i wielu składników pokarmowych, zwłaszcza magnezu, wapnia, fosforu i potasu oraz wzmożona mobilność, toksyczność i pobieranie metali wielowartościowych takich, jak glin, mangan, ołów i wielu innych, które mogą oddziaływać toksycznie.

Zbożem najbardziej wrażliwym na kwaśny odczyn gleby (w tym na mobilne formy glinu) jest jęczmień, a w dalszej kolejności pszenica. Natomiast obecność metali ciężkich takich, jak Pb i Cd w glebie wpływa na jakość plonów ziarna w sposób znaczący, ponieważ przekroczenie dopuszczalnej zawartości tych pierwiastków w interwencyjnym zakupie zbóż (powyżej 0,2 mg kg⁻¹) dyskwalifikuje ziarno do dalszego przetwarzania i konsumpcji.

Występowanie substancji niepożądanych w surowcach roślinnych, niesie ze sobą ryzyko zagrożenia dla zdrowia konsumentów. Bezpieczeństwo produkcji roślinnej jest zatem ściśle powiązane ze stanem środowiska przyrodniczego. Metale takie jak Al, czy Pb wpływają negatywnie na organizmy i odznaczają się także stosunkowo dużą fitotoksycznością, przy czym ich funkcja biologiczna u ludzi nie została do dziś poznana, stanowią zatem zbędne elementy w łańcuchu troficznym, niestety, mają tendencje do bioakumulacji, dlatego z punktu widzenia jakości żywności należą do pierwiastków groźnych dla zdrowia człowieka.

Glin, przedostający się do organizmu człowieka, jest przyczyną zaników pamięci, obniżenia poziomu intelektualnego i powoduje nadmierną łamliwość kości. W mózgu chorych na Alzheimera stwierdzono obecność aluminium w charakterystycznych dla tej przypadłości złogach amyloidu. Wykazano, że pierwiastek ten tworzy trwałe związki, między innymi z fosfolipidami obecnymi w tkance nerwowej i blokuje aktywność enzymów biorących udział w przewodzeniu bodźców nerwowych.

Ołów i jego trujące właściwości znane są od wieków. W wyniku zatrucia się człowieka tym pierwiastkiem obserwuje się bóle głowy, nudności, wymioty, a także objawy psychiczne w postaci niepokoju oraz zaburzeń pamięci i koncentracji. Pierwiastek ten należy do grupy tzw. „pierwiastków śmierci” (obok Cd, Hg, As). Dawka ołowiu przekraczająca 35 mg w 100 mililitrach krwi może już wywołać zmiany w centralnym układzie nerwowym człowieka.

Dostępność glinu i ołowiu dla roślin uzależniona jest przede wszystkim od wartości pH gleby. Wraz ze zwiększeniem się jej zakwaszenia wzrasta liczba form monomerycznych glinu i mobilnych form ołowiu, a zatem najbardziej przyswajalnych i toksycznych dla roślin.

Rośliny w różnych ilościach akumulują glin i ołów w swoich tkankach, zależnie od gatunku, odmiany i części rośliny (korzenie > łodygi > liście > owoce).

W kontekście powyższych rozważań należy podkreślić, że zarówno wybór jonów metali do badań, jak i testowanej rośliny przez Doktoranta, jest jak najbardziej aktualny i ważny z punktu widzenia pozyskiwania odpowiedniej jakości żywności w zmieniającym się środowisku przyrodniczym. Pan mgr inż. Piotr Bulak założył w hipotezie badawczej, że łączne oddziaływanie jonów glinu i ołowiu na pszenicę silnie ogranicza jej wzrost oraz nasila stres oksydacyjny niż jony tych metali działające pojedynczo. Doktorant założył również, że zjawisko to jest silniejsze w warunkach zakwaszenia.

Biorąc pod uwagę możliwość współistnienia obydwu tych jonów zarówno w środowisku przyrodniczym, jak i w organizmach żywych, a także chemizm badanych metali, ich sposób przemieszczania się i dystrybucji w glebach i roślinach, uważam, że tematyka badawcza jest innowacyjna i bardzo interesująca.

2. Ocena merytoryczna

Doktorant prawidłowo postawił hipotezę badawczą oraz właściwie podał cele badań, które posłużyły do sprawdzenia założonej hipotezy. Najważniejszym celem, który postawił sobie Pan mgr inż. Piotr Bulak było zbadanie odpowiedzi obronnej i parametrów wzrostu pszenicy (korzeni i pędów oraz suchej i świeżej masy korzeni i pędów) wobec zastosowanych stresorów podanych oddzielnie i razem w modelowych warunkach hydroponicznych. Dawki glinu i ołowiu zastosowane były na czterech poziomach toksyczności oraz przy dwóch poziomach pH (silnie kwaśnym – pH =4 i optymalnym dla wzrostu pszenicy, czyli pH = 6). Przy czym zastosowane dawki glinu i ołowiu odpowiadały w przybliżeniu stężeniom tych metali, które spotyka się w glebach. **Drugim ważnym celem badań** były zmiany parametrów biochemicznych pszenicy w warunkach stresogennych, takich, jak: aktywność enzymów antyoksydacyjnych (SOD, CAT, APX, GR i GRX), stopień stresu oksydacyjnego (LPO) mierzonego metodą oznaczania zawartości dialdehydu malonowego (TBARS), ogólna aktywność antyrodnikowa (anty-ABTS), a także takich wskaźników, jak: zawartość białka oraz metali w tkankach roślinnych.

Założone cele wynikały bezpośrednio z bardzo przemyślanego „Przeglądu literatury”, który Doktorant przedstawił w sposób logiczny i bardzo szczegółowy. W pięciu głównych podrozdziałach Pan mgr inż. Piotr Bulak przedstawił: światowe znaczenie

pszenicy, zjawisko stresu abiotycznego i stresu oksydacyjnego, mechanizmy obronne roślin przed stresem abiotycznym, wybrane stesy abiotyczne i strategie przetrwania roślin w obecności metali, a także abiotyczne czynniki stresowe w ekosystemach rolniczych. Przy czym na szczególną uwagę zasługuje tutaj rozdział o mechanizmach obronnych roślin, który jest najbardziej obszerny i porusza m.in. problemy enzymatycznego i nieenzymatycznego aparatu antyoksydacyjnego. **Tak przedstawiony „Przegląd literatury” pozwolił Doktorantowi na logiczne przeprowadzenie swoich własnych badań, a także na ciekawą i obszerną „Dyskusję” wyników.**

W rozdziale „**Materiały i metody**” Doktorant w sposób szczegółowy scharakteryzował wybrany do analiz materiał roślinny (pszenica z klasy jakości A – przydatna do wypieku chleba), następnie szczegółowo przedstawił sposób założenia doświadczeń hydroponicznych oraz przedstawił klarownie na rysunku schemat całościowego doświadczenia. Pan mgr inż. Piotr Bulak dokładnie również opisał w jaki sposób został pobrany materiał roślinnych i jak przygotował homogenaty roślinne do badań laboratoryjnych.

Zarówno procedura przeprowadzenia doświadczeń, jak i etapów badań laboratoryjnych, została pokazana prawidłowo. W pracy zastosowano profesjonalne metody i instrumenty badawcze, które szczegółowo zostały opisane. Doktorant zastosował także obliczenia statystyczne, wyjaśniając celowość zastosowanych testów.

Należy tu podkreślić rozległość i różnorodność użytych metod i technik badawczych, co wskazuje dobitnie, że Pan mgr inż. Piotr Bulak w bardzo dobrym stopniu opanował procedury badawcze związane z prezentowanymi zagadnieniami. Świadczy o tym także zrozumiały opis wszystkich tych metod.

Rozdział „Wyniki” został logicznie podzielony przez Doktoranta na siedem podrozdziałów omówionych według wcześniej założonych celów badawczych. Należy podkreślić, że Pan mgr inż. Piotr Bulak bardzo jasno, klarownie, szczegółowo i wielostronnie przedstawił otrzymane wyniki swoich badań. Czytelnik nie gubi wątku, wchodząc coraz głębiej w omawiane zjawiska. Opis wyników można łatwo odnieść do schematu badań i łatwo powiązać z treściami zawartymi w „Przeglądzie literatury”. Opis wyników mieści się na 70 stronach. Zawiera celowe, klarowne rysunki i tabele, które ułatwiają zrozumienie omawianych treści. Rozdział „Dyskusja” stanowi 34-stronicowe opracowanie podzielone na dwa główne, ale bardzo obszerne podrozdziały opisujące: 7.1. pH 6 vs pH 4 oraz 7.2. wpływ jonów glinu, ołowiu oraz kwaśnego odczynu (a nie kwaśnego pH – takie sformułowanie jest błędne) na badane parametry.

Do wybranych, istotnych elementów nowatorskich otrzymanych w niniejszej pracy należy to, że Doktorant wysuwa ze swoich badań następane hipotezy do przebadania w przyszłości, a mianowicie:

- a) **W czasie trwania stresu (pH=4) następuje obniżenie ogólnej aktywności antyrodnikowej (anty-ABTS), co być może związane jest ze wzrastającą w tym samym czasie aktywnością GPX (peroksydazy gwajakolowej). Może z tego wynikać, że zwiększona lignifikacja ściany stanowi rodzaj bariery mechanicznej dla nadmiaru rodników. Zwiększenie biomasy pędów może być też związane z percepcją stresu i transdukcją sygnału z korzeni do pędów dzięki aktywowaniu szlaków sygnałowych, lecz brak jest dostępnej literatury na ten temat.**
- b) **W warunkach stresu przy pH = 4 aparat antyoksydacyjny był rozregulowany i nie był w stanie ochronić rośliny przed zahamowaniem tempa wzrostu, o czym mógł świadczyć brak zmiany w stosunku do kontroli albo zmniejszenie się**

aktywności pozostałych enzymów, takich, jak: SOD – dysmutazy ponadtlenkowej, CAT – aktywności katalazy, APX – aktywności peroksydazy askorbinianowej, GR – reduktazy glutationowej.

- c) W świetle prezentowanych badań widoczna jest także potrzeba badań wyjaśniających udział niskocząsteczkowego aparatu antyoksydacyjnego i enzymów cyklu askorbinowo-glutationowego podczas stresu związanego z niskim pH. Ponadto interesujące byłyby badania nad dynamiką przenoszenia się zakwaszania apoplastu od korzeni wzdłuż pędu i jak to wpływa na pH cytozolu u roślin pszenicy.

Czyli z przedstawionych wyżej podpunktów wynika pytanie: „w jakim stopniu obserwowane przez Doktoranta zmiany parametrów biochemicznych rośliny zależą od zmian pH tkanek, a w jakim stopniu są wynikiem aktywacji różnych szlaków sygnałowych wzdłuż osi korzeń-pęd?”

- d) Przeprowadzone badania sugerują także, że łączny wpływ Al+Pb może być inny w roślinach jednoliściennych (jak pszenica) i dwuliściennych (np. soja) opisywanych w literaturze. Przy czym moim zdaniem istotny może tu być także wpływ anionu towarzyszącego (chlorek glinu i azotan (V) ołowiu), bowiem obecność azotanów stymulować może pobieranie ołowiu, podobnie dzieje się z kadmem.
- e) Oprócz potencjalnych interakcji metali ze składnikami pożywki, zaobserwowano przy pH = 6 zjawisko ekskluzji, które jest najbardziej rozpowszechnionym mechanizmem tolerancji na glin. Przy czym zjawisko ekskluzji z pędów można było zaobserwować w niniejszych badaniach dla obydwu badanych jonów metali we wszystkich wariantach dla pH = 6. Należy pamiętać, że ta wartość pH generalnie nie sprzyja mobilizacji ani jonów glinu, ani ołowiu.
- f) Wpływ jonów glinu i ołowiu na zmiany w zawartości białka rozpuszczalnego był niejednorodny, choć przeważała tendencja malejąca wraz ze wzrostem dawki, natomiast wpływ badanych metali na peroksydacje lipidów był specyficzny i zależny od dawki metalu.
- g) Prezentowane wyniki badań łącznego oddziaływania jonów glinu i ołowiu przy pH = 4 i pH = 6 powiększają niewielką, jak do tej pory, pulę badań potwierdzających idiosynkrazję (odpowiedź rośliny całkowicie inna niż na pojedyncze sensory) wśród interakcji sensorów abiotycznych.

Reasumując wyniki badań i dyskusję, przedstawione przez Pana mgr inż. Piotra Bulaka, należy stwierdzić, że są one napisane zrozumiale i dostarczają cennych informacji z zakresu reakcji roślin na stresory „glinowe i ołowiane”, zastosowane razem i oddzielnie. **Szczególnie cennych informacji dostarczyły badania parametrów biochemicznych, które zmieniają się w zależności od dawek stresorów i wartości pH.**

Rozdział „Wnioski” podzielony został na dwa podrozdziały, w których Pan mgr inż. Piotr Bulak przedstawił prawidłowo dwa obszernie wnioski ogólne oraz 8 szczegółowych.

Należy tu dodać, że wyniki badań przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej, mają przede wszystkim implikacje praktyczne, gdyż próbują wyjaśnić mechanizmy obronne roślin pszenicy na występowanie więcej niż jednego stresora podczas jej wzrostu i rozwoju, a takie warunki mają często miejsce w naturalnym środowisku przyrodniczym.

Rozdział „Literatura” zawiera 150 pozycji najnowszej literatury. Przy czym tylko 7 pozycji jest w języku polskim. **Świadczy to o ogromnym odczytaniu Doktoranta w literaturze światowej.**

3. Ocena formalna pracy

Rozprawa doktorska pt. *„Wpływ jonów glinu i ołowiu na wybrane parametry biochemiczne i wzrost pszenicy zwyczajnej”* autorstwa Pana mgr inż. Piotra Bulaka jest 185-stronicowym opracowaniem podzielonym na 10 głównych rozdziałów, które następnie zostały logicznie podzielone na szczegółowe, ale klarowne podrozdziały. Dodatkowo w pracy zamieszczone są streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wykaz tabel (dwie), rysunków (109) i jeden schemat doświadczenia, które zostały zamieszczone w tekście w sposób klarowny i przejrzysty.

Należy podkreślić, że niniejsza rozprawa doktorska zawiera wszystkie niezbędne rozdziały wymagane w takich opracowaniach. Rozprawa doktorska Pana mgr inż. Piotra Bulaka spełnia zatem wymogi formalne, a Autor jawi się jako osoba niezwykle pracowita, skrupulatna i dokładna oraz o dużej znajomości literatury światowej związanej z tematem niniejszej pracy.

4. Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pana mgr inż. Piotra Bulaka pt. *„Wpływ jonów glinu i ołowiu na wybrane parametry biochemiczne i wzrost pszenicy zwyczajnej”* stanowi: (i) oryginalne rozwiązanie problemu naukowego z elementami nowatorskimi włącznie, (ii) udowadnia szeroką wiedzę Doktoranta w prezentowanej przez Niego dziedzinie naukowej.

Należy dodatkowo podkreślić, że wysoki poziom niniejszej pracy doktorskiej w zakresie wiedzy teoretyczno-laboratoryjnej znakomicie przekłada się na zastosowania praktyczne w skali krajowej i globalnej. Znajomość bowiem mechanizmów reakcji roślin na stresy związane z zakwaszeniem oraz obecnością takich „metali śmierci”, jak Al i Pb może przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów obronnych roślin przed toksycznymi pierwiastkami, co ma wpływ na cały łańcuch troficzny, a przez to na ilość i jakość surowców konsumpcyjnych.

Praca spełnia ponadto wszelkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 30 października 2015 r. **Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN o dopuszczenie Pana mgr inż. Piotra Bulaka do dalszych czynności związanych z przewodem doktorskim i wnoszę jednocześnie o wyróżnienie niniejszej pracy i jej Autora stosowną nagrodą.**

Lublin, 24 czerwca 2016 r.

Prof. dr hab. Aleksandra Badora