



UMCS
UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

Wydział Chemii,

Plac Marii Curie-Skłodowskiej 3

20-031 Lublin



Tel. +48 81 537 5704

Fax: +48 81 533-33-48 e-mail: rdobrow@poczta.umcs.lublin.pl

Prof. dr hab. Ryszard Dobrowolski
Zakład Chemii Analitycznej i Analizy Instrumentalnej

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Kariny KRZCIUK
pt.: „Spektrometria mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej w poszukiwaniu
roślin o zdolnościach akumulacji pierwiastków śladowych”

Uwagi wstępne

Badanie reakcji roślin na duże zawartości pierwiastków śladowych w podłożu glebowym, na którym rosną jest przedmiotem intensywnych badań prowadzonych w wielu ośrodkach naukowych. Wiedza nt. zachowania się roślin, mechanizmów umożliwiających im wzrost i rozwój w warunkach stresu powodowanego nadmiarem pierwiastków śladowych w glebie oraz występowaniem nietypowych interakcji między nimi ma duże znaczenie zarówno poznawcze jak i praktyczne. Rośliny wykształciły dwa mechanizmy zachowania się w takiej sytuacji, pierwszy z nich polega na unikaniu czynnika stresowego drugi natomiast na ich fizjologicznym przystosowaniu się do przyswajania i neutralizowania substancji szkodliwych. Mechanizmy tolerancji roślin na duże zawartości pierwiastków śladowych w podłożu glebowym można szczegółowo badać na poziomie komórkowym oraz osobniczym. Prowadzone są także równoległe badania wpływu formy specyjalnej danego pierwiastka zawartego w podłożu glebowym na jego przyswajalność przez daną roślinę. Wśród roślin zdolnych do wzrostu na glebach o dużej zawartości pierwiastków śladowych, w tym pierwiastków toksycznych, szczególne miejsce zajmują rośliny zwane akumulatorami, z wyróżnioną klasą roślin zwanych hiperakumulatorami, zdolnych do ponadprzeciętnej akumulacji pierwiastków śladowych w organach nadziemnych. Należy dodać, że wciąż nieznaną są przyczyny akumulowania przez rośliny pierwiastków, które mogą być fitotoksyczne. Wśród wielu hipotez godne uwagi są przypuszczenia, że akumulacja toksycznych pierwiastków ma na celu: ochronę przed roślinożercami lub patogenami, regulację ciśnienia osmotycznego w komórkach roślin rosnących na glebach zasolonych, zwiększenie tolerancji roślin na pierwiastki fitotoksyczne poprzez zamknięcie ich w wakuolach czy też zwiększenie szans w konkurencji międzygatunkowej na

drodze allelopatii. Poszukiwanie roślin o zdolnościach akumulacji pierwiastków śladowych oraz badanie mechanizmu tej akumulacji jest dużym wyzwaniem badawczym, w tym także o charakterze analitycznym i chemii środowiska. W tą tematykę badawczą wpisuje się recenzowana praca doktorska mgr Kariny Krzciuk wykonana w Instytucie Chemii Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Agnieszka Gałuszka. Mgr Karina Krzciuk prowadziła badania objęte tematem pracy doktorskiej pod opieką doświadczonego Promotora, uznanego autorytetu w zakresie geochemii i analityki środowiska z wykorzystaniem zaawansowanych technik pomiarowych. Doktorantka miała więc dostęp do bardzo dobrze zorganizowanego i wyposażonego warsztatu naukowego.

Uzyskane wyniki badań mgr Karina Krzciuk dotychczas opublikowała we współautorstwie w postaci czterech artykułów naukowych w prestiżowych czasopismach analitycznych i środowiskowych o obiegu międzynarodowym, w tym dwa artykuły przeglądowe; czterech artykułów w czasopismach o obiegu krajowym oraz przedstawiła wyniki swoich badań w postaci trzech prezentacji plakatowych na konferencjach międzynarodowych.

Dobór tematu, zakres i cel pracy

Obecnie prowadzi się intensywne badania w wielu ośrodkach badawczych w zakresie poszukiwania jeszcze nie rozpoznanych roślin o zdolnościach akumulacji pierwiastków śladowych głównie w celu remediacji zanieczyszczonych gleb. Fitoremediacja, a w szczególności jej odmiana zwana fitoekstrakcją, przebiegająca z pobieraniem z gleby jonów metali i transportem przez roślinę do tkanek nadziemnych jest obiecującą technologią rekultywacji terenów zanieczyszczonych metalami z wykorzystaniem roślin. Z drugiej strony efektywny proces fitoekstrakcji a następnie odpowiednie zagospodarowanie wzbogaconej w pierwiastki śladowe biomasy jest obiecującym podejściem biotechnologicznym pozwalającym na odzyskiwanie cennych technologicznie metali. Badania jakie podjęła Doktorantka skupiały się na opracowaniu metodyki badań roślin akumulujących pierwiastki śladowe w warunkach ich naturalnego wzrostu oraz przeprowadzenie charakterystyki wybranych gatunków roślin pod względem ich zdolności akumulacyjnych. Podjęcie tej tematyki przez Doktorantkę uważam za uzasadnione. Tego typu badania są intensywnie prowadzone na świecie, a praca doktorska stanowi istotne ich uzupełnienie. Wybór grupy roślin poddanych badaniom był podyktowany względami racjonalnymi tj. ich liczebnością na badanych terenach, łatwością ich identyfikacji oraz ilością produkowanej biomasy dla danej powierzchni i określonego czasu. Efektywność transportu jonów metali z podłoża glebowego do korzeni badanych roślin a także nadziemnej

części roślin była badana poprzez zastosowanie spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej. Zastosowanie tej techniki jest w pełni uzasadnione z uwagi na włączenie lantanowców do grupy badanych metali.

Uważam, że zakres zaplanowanych i przeprowadzonych badań w pracy pozwolił na realizację postanowionego celu, a tezy pracy zostały właściwie sformułowane.

Konstrukcja pracy

Praca liczy 111 stron i zasadniczo podzielona jest na dwie główne części: część literaturową i część eksperymentalną. Dodatkowo praca zawiera dwa załączniki, o dorobku naukowym Doktorantki a także dokumentację fotograficzną stanowisk badawczych. CZEŚĆ LITERATUROWA pracy poprzedza wykaz stosowanych skrótów oraz stronicowe STRESZCZENIE, w którym Autorka podsumowała najważniejsze osiągnięcia, a następnie stronicowe wprowadzenie w tematykę badawczą pt. WSTĘP w którym to został określony główny cel podejmowanych badań.

W CZEŚCI DOŚWIADCZALNEJ Autorka zamieściła w kolejności rozdziały: Metodyka badań, Wyniki badań, Dyskusja wyników, Wnioski oraz wyodrębniła poza tymi rozdziałami spis cytowanej literatury.

Praca zawiera 55 tabel i 27 rysunków. Pani mgr Karina Krzciuk w dysertacji zacytowała 324 pozycje literaturowe związane z tematem pracy. Cytowana w pracy literatura składa się z nowych prac, ponad 50% z nich to prace, które ukazały się po roku 2005, a 20,1% to prace z lat dziewięćdziesiątych i wcześniejszych. Wskazuje to, że temat pracy dotyczy bardzo aktualnych zagadnień.

CZEŚĆ LITERATUROWA została podzielona na dwie sekcje. W pierwszej Autorka opisała akumulację pierwiastków śladowych przez rośliny ze szczególnym uwzględnieniem roślin - akumulatorów i hiperakumulatorów a także ich roli w procesach remediacji gleb skażonych związkami metali, w tym metali uznawanych za toksyczne już w ilościach śladowych. Rozdział ten jest opatrzony zestawieniem literaturowym nt. znaczenia pierwiastków śladowych dla roślin. W ten sposób czytelnik jest wyposażony w podstawową wiedzę dotyczącą roli pierwiastków śladowych dla wzrostu roślin a także progowych dawek toksycznych. Szkoda, że Doktorantka nie zdefiniowała bardziej precyzyjnie co rozumie przez dawkę toksyczną i jakie są skutki jej przekroczenia. W następnej części pierwszego rozdziału Autorka szczegółowo opisała podział roślin ze względu na strategię tolerancji na nadmiar pierwiastków śladowych w glebie oraz podała definicje współczynników wykorzystywanych do analizy akumulacji

pierwiastków przez rośliny i ich użyteczności do kwalifikacji roślin. Rozdział pierwszy zakończony jest przeglądem literaturowym metod poszukiwania nowych hiperakumulatorów. Autorka z dużą swobodą kreśli złożoność badania zjawiska hiperakumulacji w kontekście metodologii poszukiwania roślin - hiperakumulatorów zwracając szczególną uwagę na zalety i wady różnych podejść metodycznych. W poszukiwaniu hiperakumulatorów i ich lokalizacji Doktorantka zwraca szczególną uwagę na rolę gleb serpentynitowych rozwiniętych na skałach ultramaficznych bogatych w pierwiastki śladowe i zasiedlanie ich przez hiperakumulatory w sposób niejako „naturalny”. Szkoda, że Autorka nie poruszyła w tym podrozdziale także zagadnień związanych z biodostępnością pierwiastków śladowych w zależności od ich formy specyficznej w kontekście rodzaju gleby i występowaniu na niej roślin zdolnych do akumulacji pierwiastków toksycznych.

W drugiej sekcji przeglądu literaturowego Autorka opisuje problemy związane z analizą chemicznych próbek ze szczególnym uwzględnieniem badań roślin akumulujących pierwiastki śladowe. Wiele miejsca poświęca etapowi pobierania próbek roślin, ich homogenizacji oraz metodom roztwarzania przed właściwym pomiarem spektrometrycznym. W przeglądzie metod i technik analitycznych stosowanych do oznaczania zawartości metali śladowych w roślinach hiperakumulatorach zostały uwzględnione te, które są wykorzystywane do oznaczania ich całkowitej zawartości w próbkach materiału roślinnego jak również te, które służą do rozpoznawania specyficznych miejsc w organach roślinnych do akumulacji pierwiastków śladowych. Autorka starała się udowodnić tezę, że zastosowanie tzw. analizy półilościowej z wykorzystaniem zaawansowanej techniki ICP-MS niesie ze sobą oszczędność odczynników, zmniejszenia kosztów i czasu potrzebnego do wykonania analizy przesiewowej. O ile oszczędność odczynników i działania analityczne w kierunku zielonej chemii niosą ze sobą głęboki sens, o tyle oszczędność czasu i zmniejszenia kosztów analizy nie są już tak krytycznym parametrem z uwagi choćby na koszty aparaturowe a także założony zakres pierwiastkowy prowadzonych badań. Odrębnym zagadnieniem jest jakość metrologiczna tak uzyskanych wyników analizy pierwiastkowej. Należy podkreślić, że w przypadku materiału roślinnego cechującego się niezbyt skomplikowaną matrycą, przy właściwym przygotowaniu próbek, uzyskane wyniki analizy pierwiastkowej mogą być zadawalające przy wstępnie określonej akceptacji ich precyzji. Głębszej dyskusji dotyczącej tego zagadnienia będę oczekiwał podczas obrony pracy doktorskiej.

Część doświadczalna pracy doktorskiej mgr Kariny Krzciuk, zawarta na str. 42-95, podzielona jest na trzy rozdziały. Jest ona prawie dwukrotnie bardziej obszerna od części literaturowej. W części doświadczalnej Autorka zamieściła 42 tabele i 17 rysunków. Układ części doświadczalnej pracy jest typowy dla dysertacji w dziedzinie chemii. Opis metodyki

badania jest klarowny i dobrze koresponduje z częścią literaturową recenzowanej pracy doktorskiej. Opis lokalizacji stanowisk badawczych nie budzi zastrzeżeń a ich wybór ma głęboki sens poznawczy z uwagi na znaczne zróżnicowanie środowiskowe tych miejsc. Wstępnie do badań zakwalifikowano trzy stanowiska, na każdym stanowisku badano w sposób półilościowy techniką ICP-MS zawartość wybranych metali w próbkach co najmniej dziewięciu różnych gatunków roślin. Po wykonaniu tego zadania badawczego na podstawie uzyskanych wyników badań wybrano 10 roślinnych materiałów do dalszej analizy ilościowej na zawartość wybranych pierwiastków. W celu określenia wpływu siedliska na zawartość metali w badanych roślinach trzy z pośród gatunków roślin, których próbki poddano analizie ilościowej, pobrano ponownie z innych siedlisk i wykonano stosowne oznaczenia nakreślone programem badawczym. Metodologia ta jest w pełni poprawna i uwzględnia również wpływ siedliska zakładając homogeniczność składu pierwiastkowego podłoża glebowego na określonej jego powierzchni. Pobór próbek gleby został opisany zbyt ogólnie, aby ocenić poprawność postępowania z uwzględnieniem oceny homogeniczności ich składu chemicznego. Optymalizację i częściową walidację zastosowanej procedury analitycznej z wykorzystaniem techniki ICP-MS wykonano poprawnie stosując certyfikowany materiał odniesienia (CRM) NIST 1573a (liście pomidora) przy czym nie uzasadniono czym się kierowano przy wyborze CRM. Natomiast oznaczenia badanych pierwiastków w glebie wykonano techniką ED XRF z wykorzystaniem standardowej procedury zaproponowanej przez US-EPA. Zebrane wyniki oznaczeń przedstawiono w formie tabel a także diagramów słupkowych, przy czym ta druga metoda uczyniła je bardziej czytelne. Rozprawę kończą rozdziały DYSKUSJA WYNIKÓW i WNIOSKI. W rozdziałach tych Autorka przeprowadza wielowątkową dyskusję nad uzyskanymi wynikami badań w kontekście danych literaturowych. Przedstawiona dyskusja jest dość rozległa, obejmuje wszystkie etapy prowadzonych badań. Najważniejsze osiągnięcia przeprowadzonych badań Doktorantka zawarła w rozdziale WNIOSKI. Z badań objętych pracą dokorską jednoznacznie wynika, że zaproponowana dwuetapowa metodyka badań w poszukiwaniu roślin akumulujących pierwiastki śladowe z zastosowaniem techniki ICP-MS stanowi skuteczne narzędzie analityczne o istotnych walorach poznawczych i jest przyjazna dla środowiska. W wyniku przeprowadzonych badań Autorka wykazała, że gatunkiem, pod względem właściwości akumulacyjnych wyróżniającym się spośród innych badanych roślin był sit *Juncus effusus*. Dodatkowo mgr Karina Krzciuk potwierdziła zdolności kumulujące dla pięciu gatunków roślin: *Plantago media*, *Hieracium caespitosum*, *Juncus effusus*, *Rorippa amphibia* oraz *Cichorium intybus*. Jednakże, żadna z badanych roślin nie wyróżniała się tak dużymi zawartościami pierwiastków, aby można było zaliczyć ją do grupy hiperakumulatorów. W celu określenia poziomu akumulacji pierwiastków śladowych w badanych roślinach Autorka zaproponowała

metodę obliczeń przeciętnej zawartości pierwiastków śladowych z wykorzystaniem techniki wielokrotnej eliminacji wartości odstających przyjmując za kryterium kolejnych eliminacji wartość 2σ . Ponadto, w wyniku przeprowadzonych badań Autorka odkryła zdolności kumulujące mangan, europ i srebro przez sit rozpięzchły.

Uwagi krytyczne i dyskusyjne

Generalnie praca doktorska napisana jest dobrym i komunikatywnym językiem, chociaż Autorka nie ustrzegła się kilku sformułowań niepoprawnych i lapsusów językowych wynikających z tłumaczenia czy też żargonu laboratoryjnego. Przykładowo, zatytułowanie części pracy jako „CZEŚĆ TEORETYCZNA” jest niepoprawne, powinno być „CZEŚĆ LITERATUROWA”, opisując zawartość danego pierwiastka w ciele stałym (rośliny, gleby, korzenie) Autorka stosuje wyraz „stężenie”, który odnosi się do roztworów, poprawnie powinno być „zawartość”, w Tabeli 40 nie zamieszczono jednostek w których podane są wyniki. Niektóre sformułowania metrologiczne są niepoprawne, np. na str. 36 użyto sformułowania „całkowita niepewność analizy” zamiast „całkowita niepewność oznaczenia”, w przypadku tzw. analizy półilościowej nie można mówić o wiarygodności w sensie metrologicznym (bardziej poprawnie - miarodajności) wyników (str. 77) bo o miarodajności wyników można mówić wtedy, gdy wyznaczona jest ich niepewność rozszerzona i zostały zastosowane odpowiednie certyfikowane materiały odniesienia w procesie walidacji procedury analitycznej a także został zbadany odzysk badanych analitów. Inna uwaga dotyczy zapisu granicy wykrywalności, Z punktu widzenia metrologii chemicznej powinno się podawać wartość granicy wykrywalności (LOD) zamiast znaku „<”. Mam też zastrzeżenia co do opisów statystycznych stosowanych w zamieszczonych tabelach, np. w Tabeli 23 (str. 56) zamieszczono dane dotyczące odchylenia standardowego bez podania wartości średnich dla poszczególnych pierwiastków, dodatkowo dla kilku pierwiastków wartości te podano jako „0”, ostatnia uwaga dotyczy także dalszych tabeli z zamieszczonymi wynikami oznaczeń.

Jest oczywiste, że większość powyższych uwag nie ma istotnego wpływu na ocenę wartości merytorycznej wyników pracy zrealizowanych przez Doktorantkę.

Wniosek:

Stwierdzam, że praca doktorska mgr Kariny Krzciuk posiada wiele elementów nowości naukowej a cel, jaki sobie postawiła Doktorantka został w pełni zrealizowany. Do najważniejszych osiągnięć mgr Kariny Krzciuk w ramach recenzowanej dysertacji zaliczam

opracowanie dwuetapowej metodyki badań w poszukiwaniu roślin akumulujących pierwiastki śladowe z zastosowaniem techniki ICP-MS. W wyniku przeprowadzonych badań dla znacznej grupy roślin Autorka odkryła, że sit rozpięchły wykazuje zdolności kumulujące mangan, europ i srebro. Ponadto, Autorka zaproponowała nowy algorytm obliczeniowy do wyznaczenia poziomu akumulacji pierwiastków śladowych w roślinach.

Część uzyskanych wyników badań mgr Karina Krzciuk opublikowała w renomowanych czasopismach z listy filadelfijskiej o najwyższych współczynnikach oddziaływania dla grupy czasopism o charakterze analitycznym i chemii środowiska co potwierdza wysoką wartość naukową uzyskanych wyników. Na szczególne podkreślenie zasługuje opublikowanie artykułu przeglądowego w czasopiśmie *Reviews in Analytical Chemistry*, którego jest jedynym autorem, co świadczy o dużej samodzielności naukowej Doktorantki. Można oczekiwać, że dalsze opracowania uzyskanych wyników badań z zastosowaniem metod chemometrii zaowocują następnymi pracami o dużej renomie międzynarodowej.

Przedstawiona w pracy metodyka badań nie budzi zastrzeżeń, a sposób prezentacji wyników jest jasny i czytelny, zaś ich interpretacja wskazuje na to, że mgr Karina Krzciuk w oparciu o posiadaną wiedzę potrafi analizować kompetentnie i logicznie uzyskane wyniki. Występujące w pracy uchybienia edytorskie nie umniejszają wartości pracy. Podsumowując, uważam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Kariny Krzciuk całkowicie spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595 z 14 marca 2003 r.). W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Kariny Krzciuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie w przekonaniu o wysokiej wartości poznawczej i naukowej recenzowanej pracy doktorskiej zwracam się do Rady Naukowej Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Uniwersytetu Jana Kochanowskiego o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Kariny Krzciuk w stosownym trybie.

Lublin, 2016-06-22

