

prof. dr hab. Renata Gadzała-Kopciuch
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Chemii
Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Małgorzaty Guzowskiej

zatułowanej „*Dobór technik ekstrakcyjnych do określenia wpływu czynników środowiskowych na przykładzie gatunku *Calypogeia azurea*”*

wykonanej w Zakładzie Chemii Analitycznej na Wydziale Chemii
Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
pod kierunkiem Pana dr hab. Rafała Wawrzyniaka, prof. UAM

Ocena wyboru tematyki badawczej

Od niepamiętnych czasów człowiek korzysta z dobrodziejstw jakie przynosi nam środowisko naturalne, chociażby w postaci różnorodnej roślinności. To właśnie rośliny dostarczały i nadal dostarczają, szerokie spektrum związków biologicznie aktywnych, które stosowane są między innymi jako substancje lecznicze. Mogą one także dostarczać substancji będących produktem przemiany materii roślin tzw. metabolitów wtórnych, do których zalicza się między innymi wybrane glikozydy, garbniki, barwniki, olejki lotne, terpeny, sterole, saponiny, żywice czy alkaloidy. To właśnie roślinne metabolity wtórne są istotnym elementem systemu obronnego roślin przed patogenami oraz czynnikami środowiskowymi tj.: światło, temperatura, wilgotność czy zanieczyszczenia. Każdy z wymienionych czynników jest bardzo ważny dla rozwoju roślin, a jego brak lub nadmiar może stać się czynnikiem stresogennym, co w efekcie końcowym może prowadzić do zahamowania wzrostu, zmian faz rozwojowych, zmniejszenia poziomu plonowania, a w skrajnych przypadkach do zamierania roślin. Następstwem działania tych czynników jest wzrost stężenia metabolitów wtórnych w tkankach tych roślin. W celu poznania procesów zachodzących w tkance istotna jest kontrola nie tylko jakościowa, ale i ilościowa powstających metabolitów, gdzie niezbędne jest opracowanie odpowiedniej metody przygotowania próbki oraz końcowego oznaczania. Określenie zawartości lotnych związków organicznych znajdujących się w ciałach oleistych wątrobowców jest wręcz niezbędne, aby można było je stosować jako środki zawierające składniki aktywne ze względu na ich unikatowe właściwości antybakteryjne, antygrzybiczne, antyhepatotoksyczne, antyutleniające, itp. Pomimo intensywnie prowadzonych prac badawczych, wiele problemów nie doczekało się jeszcze jednoznacznych rozwiązań, co skłoniło Panią mgr Małgorzatę Guzowską do poszerzenia badań chemotaksonomicznych w oparciu o nowe procedury izolowania i oznaczania związków powstających

w wątrobowcach pod wpływem czynników środowiskowych. Rozwiązania w zakresie opracowania metodyk analitycznych mających na celu otrzymanie wiarygodnych wyników dotyczących ilościowego oznaczania metabolitów wtórnych stanowią alternatywę dla kosztownych badań genetycznych. Biorąc pod uwagę powyższe uważam, że tematyka badawcza podjęta przez Doktorantkę jest w pełni uzasadniona a prowadzone badania mieszczą się w szerokim i obecnie bardzo nośnym nurcie studiów nad badaniami fitochemicznymi.

Ocena formalna i merytoryczna rozprawy

Recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Guzowskiej licząca 193 stron posiada klasyczny układ z podziałem na *Część teoretyczną* oraz *Część doświadczalną*. W skład pierwszej z nich wchodzi siedem podrozdziałów opisaną na 52 stronach, cel pracy, trzy kolejne podrozdziały to część eksperymentalna (wykorzystana aparaturowa, metodyki izolowania analitów, wyniki i ich dyskusja – 92 strony), podsumowanie, spis rysunków i tabel, lista prac własnych (osiągnięcia Doktorantki), bibliografia oraz słownik terminów biologicznych. Bibliografia obejmuje 299 pozycji, które stanowią głównie najnowsze doniesienia literaturowe. Część teoretyczna napisana jest barwnym (wręcz kwiecistym) językiem, gdzie przeważająca jej część to opis zagadnień związanych z wątrobowcami, a więc typowe podejście biologiczne. Całość bardzo bogato i starannie ilustrowana na 34 rysunkach. Tylko 15 stron części literaturowej (rozdział 3.8 - powinno być 3.7 i 3.9 - poprawnie 3.8) Doktorantka poświęciła ściśle omówieniu zagadnień związanych z tematem rozprawy doktorskiej od strony chemicznej.

Przechodząc do oceny pracy pod względem merytorycznym, pierwszym kryterium jest umiejętność wyczerpującego, a zarazem krytycznego przedstawienia stanu wiedzy na temat problemu będącego przedmiotem badań własnych. Zadanie to Pani mgr Małgorzata Guzowska zrealizowała w siedmiu rozdziałach rozprawy doktorskiej poświęconych kolejno biologicznej charakterystyce wątrobowców, wątrobowcom z rodzaju *Calypogeia* i gatunku *Calypogeia azurea*, metabolitom wtórnym i pierwotnym, akumulacji metali w komórkach roślin, metodom ekstrakcji lotnych związków organicznych (LZO) z materiału roślinnego oraz procedur analitycznych oznaczania wybranych analitów. O ile część dotycząca opisu typowo biologicznego jest wyczerpująca, tak w przypadku chemii analitycznej jest ona skromna albo wręcz bardzo uboga. Skoro temat rozprawy doktorskiej dotyczy doboru metod przygotowania próbek, czytający spodziewa się przedstawienia najnowszych osiągnięć w tym zakresie oraz rezultatów uzyskanych przez inne ośrodki badawcze. I tu niestety czekało na mnie ogromne rozczarowanie. Rozdział ten to opis podstaw teoretycznych dotyczących różnych technik izolowania analitów (lotnych związków organicznych i metali), nie tylko tych badanych, na wysokim poziomie ogólnikowości, pięknie ozdobiony rysunkami, które nic nie wnoszą nowego, ponieważ można je odnaleźć w książkach czy podręcznikach studenckich. Podobna sytuacja dotyczy kolejnego rozdziału, który Doktorantka ograniczyła do 1,5 stronicowego opracowania, gdzie

schemat zamieszczony na rysunku 34 to połączenie metod przygotowania próbek i końcowego oznaczania. W tym przypadku tytuł tego rozdziału *Procedura analityczna oznaczania lotnych związków organicznych* powinien być zmieniony, gdyż uwzględniono tu metody przygotowania próbek oraz związki, które nie są lotne. Pomimo tych niedociągnięć część teoretyczna rozprawy jest wystarczającym wprowadzeniem do realizacji celu, który postawiła sobie Doktorantka i prowadzi do opisanie problemu badawczego oraz uzasadnia jego podjęcie.

W części doświadczalnej rozprawy doktorskiej, którą stanowi rozdział czwarty, Doktorantka powinna wykazać się umiejętnością jasnego określenia problemu, sformułowania celu pracy, pytań badawczych i hipotez. Celem badawczym jaki postawiła sobie Pani mgr Małgorzata Guzowska był dobór odpowiedniej techniki ekstrakcyjnej do izolowania związków organicznych obecnych w ciałach oleistych wątrobowców z gatunku *Calypogeia azurea*. Trudno powiedzieć, czy w tej formie cel wnosi jakikolwiek element poznaczy i naukowy. Zabrakło tutaj też poprawnie postawionej tezy poruszanego problemu badawczego oraz celów szczegółowych, które zostały zastąpione poprzez etapy wyznaczone do realizacji zadań badawczych.

Część eksperymentalną Doktorantka rozpoczęła od zestawienia wykorzystanej aparatury i sprzętu laboratoryjnego, po czym przeszła do opisu metodyk izolowania lotnych związków organicznych, wyboru materiału do badań oraz procedury oznaczania LZO i wybranych metali. Bardzo szczegółowo opisania została metodyka pobierania próbek materiału roślinnego w sezonie wiosennym, letnim i jesiennym wraz ze zobrazowaniem miejsc ich pobierania. Głównym rozdziałem tej części rozprawy doktorskiej jest zestawienie wyników uzyskanych w trakcie realizacji zadań badawczych (*Wyniki i dyskusja* - rozdział 6), które przedstawiono w postaci 26 tabel i 17 rysunków. W pierwszym podrozdziale Doktorantka zestawiała wyniki uzyskane z izolowania LZO z materiału roślinnego stosując: hydrodestylację (HD), ekstrakcję ciał stałe-ciecz (SLE), ekstrakcję wspomaganą rozpuszczalnikiem i mikroekstrakcję do fazy stałej (SPME). W wyniku przeprowadzanej analizy statystycznej stwierdziła, że SPME umożliwia wyekstrahowanie największej liczny związków w dość szerokim zakresie stężeń w porównaniu z pozostałymi technikami. Wybór tej techniki ekstrakcyjnej umożliwił dalsze badania mające na celu określenie wpływu czynników abiotycznych na zawartość badanych związków lotnych występujących w wątrobowcach. Uzyskane rezultaty pozwoliły Pani mgr Małgorzacie Guzowskiej na wysnucie wniosków, że wątrobowce są podatne na stres wywołany czynnikami środowiskowymi oraz reakcje ochronne roślin. W badaniach tych Doktorantka uwzględniła również czynniki laboratoryjne, a więc wpływ czasu i rodzaju w jakich przechowywane były próbki, które znacząco wpływają na obniżenie zawartości LZO.

Ostatnia część pracy eksperymentalnej dotyczyła analizy zawartości metali w komórkach *Calypogeia azurea*. Pani mgr Małgorzata Guzowska skupiła się na poszukiwaniu korelacji pomiędzy zawartością metali o znaczeniu biologicznym w podłożu

a ich zawartością w badanym gatunku wątrobowca. Rezultaty tych badań doprowadziły Doktorantkę do wniosku, że wybrana do badań roślina może służyć jako bioindykator do monitorowania zanieczyszczenia środowiska metalami.

W tych badaniach zabrakło mi potwierdzenia wiarygodności zastosowanych metod analitycznych, zarówno do oznaczania LZO, jak i metali w oparciu o podstawowe kryteria akceptacji (walidacja).

Do najważniejszych osiągnięć omawianej rozprawy doktorskiej należy zaliczyć:

- opracowanie metodyki izolowania LZO wątrobowców z gatunku *Calypogeia azurea* za pomocą SPME w połączeniu z chromatografią gazową,
- określenie wpływu czynników środowiskowych na zawartość LZO w badanym materiale roślinnym,
- opis względnej zawartości metabolitów wtórnych w zależności od pory roku,
- ocenę zakresu stosowalności wątrobowców jako bioindykatorów zanieczyszczenia środowiska metali.

Kolejnym kryterium oceny pracy naukowej jest dobór metod oraz umiejętność posługiwania się zastosowanymi w pracy narzędziami badawczymi. Wybór odpowiedniej metody przygotowania próbek do izolowania lotnych związków organicznych czy metali z materiału roślinnego oraz techniki ich oznaczania nie budzą zastrzeżeń. Podobnie w przypadku sposobu prezentacji i interpretacji uzyskanych wyników z przeprowadzonych analiz, które przedstawiono w przejrzysty sposób i w zdecydowanej większości przypadków prawidłowo zinterpretowane.

Warto podkreślić, że Doktorantka opublikowała znaczącą część wyników badań w dwóch artykułach w czasopiśmie *Molecules* (obie ukazały się w 2022 r.). Jedna z publikacji dotyczy zmienności sezonowej i wpływu przechowywania próbek na składniki lotne zawarte w *Calypogeia azurea*, zaś druga – to porównanie wyników uzyskanych za pomocą różnych technik ekstrakcji lotnych związków organicznych w próbkach wątrobowców. Ponadto, Pani mgr Małgorzata Guzowska prezentowała swoje wyniki badań na 17 konferencjach krajowych i międzynarodowych, jednak nie wskazano jaka była to forma - w postaci posterów czy wystąpień ustnych. Wybrane wyniki były też podstawą do przygotowania trzech artykułów w materiałach pokonferencyjnych i jednym w czasopiśmie branżowym *Laboratorium – Przegląd Ogólnopolski*.

Rozprawa doktorska zawiera wyniki badań uzyskane w trakcie realizacji projektu naukowego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki OPUS 14 nt. *Zróżnicowanie gatunków z rodzaju Calypogeia pod względem zawartości terpenoidów oraz ich antymikrobiologicznej aktywności* (2017/27/B/NZ8/01091), którego kierownikiem był Prof. dr hab. Wiesław Wasiak oraz w ramach Programu Międzynarodowych i Interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

„HighChem” (Projekt nr POWR.03.02.00-00-I020/17 dofinansowany z Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój osi priorytetowej III. Szkolnictwo wyższe dla gospodarki i rozwoju, działania: 3.2 Studia doktoranckie).

Podsumowując tą część mojej oceny stwierdzam, że Doktorantka zrealizowała cel pracy, dobrała odpowiednie metody badacze, w przemyślany sposób zinterpretowała uzyskane wyniki, a także poprawnie sformułowała wnioski. Skrupulatnie zaplanowane zagadnienia badacze zostały konsekwentnie zrealizowane z wykorzystaniem szeregu popularnych metod i technik eksperymentalnych, a uzyskane wyniki Doktorantka dogłębnie przeanalizowała i skorelowała z aktualnymi danymi literaturowymi. Pozwala to stwierdzić, że oceniana rozprawa wnosi elementy nowości i poszerza aktualny stan wiedzy w zakresie badań chemotaksonomicznych.

Uwagi szczegółowe

Rolą recenzenta, choć niewdzięczną, jest także wskazywanie pewnych niedokładności, błędnych sformułowań oraz przede wszystkim ocena merytoryczna, która ma wskazać pewne niejasności czy sugestie. W rozprawie doktorskiej zauważyłam pewne wątpliwe sformułowania oraz drobne uchybienia czy błędy redakcyjne. Proszę o wyjaśnienie:

- terminu *izolacja*, który jest przez Doktorantkę stosowany w całej rozprawie doktorskiej w odniesieniu do metod przygotowania próbek i wielu innych zwrotów m.in.: *wysokoprężące związki* (str. 7), *interferenty* (str. 42), *uczynienie ekstraktów kompatybilnymi* (str. 42), *aspekt nieorganiczny* (str. 58), *rozpuszczalnik lotny*, *polary o momencie dipolowym* (str. 62), *pogorszenie stanu związków* (str. 138),
- czy poprawnie użyto terminu *zakres toksyczności* przy omawianiu efektów toksyczności? (str. 35),
- rozbieżności w nazewnictwie klasyfikacji metod ekstrakcyjnych znajdujących się w rozprawie doktorskiej (Rys. 28, str. 43) względem oryginału tego rysunku w artykule (Ref. 228),
- w jaki sposób przygotowany był wstępnie materiał roślinny przed wykonaniem ekstrakcji czy destylacji? W jaki sposób przeprowadzono rozrywanie ściany komórkowej rośliny? (str. 61-65),
- czy odchylenia względnej zawartości procentowej uzyskane dla ekstrahowanego 1,4-dimetyloazulenu i anastreptenu są jednakowe dla wszystkich metod ekstrakcyjnych? (Rys. 45, str. 92),
- jak to możliwe, że wartość odchyień standardowych są większe nawet dwukrotnie od średniej różnic M? (Tabele od 16 do 20),

- w jakim celu zamieszczono chromatogramy (Rys. 46 i 47), gdzie jak twierdzi Doktorantka: *nie obserwuje się żadnych różnic w intensywności pików i ich ilości* (wniosek na str. 93),
- numeracji na osi OX (Rys. 49),
- gdzie można odnaleźć widma masowe, gdyż Doktorantka pisze: *związki opisano za pomocą widm mas* (str. 106),
- zapisu, cytuję: *w postaci arsenianu [As(V)], w arsenit [As(III)]* (str. 146),
- czy w przypadku wykorzystanych metodach przygotowania próbek w celu izolowania związków z wątrobowców wyznaczano odzysk? Czy uwzględniono w badaniach efekt matrycy? Czy wyznaczano LOD i LOQ w przypadku ilościowego oznaczania wybranych analitów?

Przytoczone uwagi nie mają w żadnej mierze negatywnego charakteru i nie wpływają na moją pozytywną ocenę oraz jakość wykonywanych przez Doktorantkę badań, a jedynie stanowią podstawę do dyskusji.

Podsumowując moją ocenę pragnę podkreślić, że rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Guzowskiej prezentuje spójne wyniki zmierzające do określenia wpływu badanych czynników środowiskowych na zawartość lotnych związków organicznych, których oznaczenie było możliwe dzięki dokonaniu doboru odpowiednich parametrów w wybranych metodach przygotowania próbek.

Wniosek końcowy

Podsumowując swoją recenzję stwierdzam, że cel naukowy został osiągnięty, zaplanowane badania w pełni zrealizowane, a rozprawa doktorska zawiera elementy nowości naukowej, potwierdzone uzyskanymi wynikami wchodzącymi w jej skład. Krytycznie podejście Doktorantki do uzyskanych wyników świadczy o dojrzałości naukowej i znajomości zagadnień diskutowanych w pracy. Mogę więc stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Guzowskiej pt. „*Dobór technik ekstrakcyjnych do określenia wpływu czynników środowiskowych przykładzie Calypogeia azurea*” spełnia wymogi właściwej ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym w związku z powyższym przedkładam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu im. Adama Mackiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Renata Gadzińska-Kopciuch