

Prof. dr hab. Anna Stochmal
Zakład Biochemii i Jakości Plonów
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa
Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

**Ocena pracy doktorskiej mgr Dariusza Kruszki, pod tytułem
„Zmiany metabolomu *Arabidopsis thaliana* i *Hypericum perforatum* w odpowiedzi na
oddziaływanie nanocząstek metali”,
wykonanej w Zakładzie Biologii Roślin i Nanotechnologii, Instytutu Genetyki Roślin,
Polskiej Akademii Nauk**

Przedstawiona do oceny przez Pana mgr Dariusza Kruszkę dysertacja na 130 stronach zawiera 51 rysunków, 8 tabel oraz liczący 208 pozycji wykaz literatury, w którym 100% stanowią angielskojęzyczne artykuły, w tym: tylko 3 cytacje pochodzą z poprzedniego wieku, a pozostałe pozycje, to artykuły najnowszej wiedzy światowej. Już ten fakt świadczy o tym, że wybrany przez Doktoranta temat mieści się wśród nowoczesnej tematyki badawczej.

Na początku pracy mgr Dariusz Kruszka zamieścił informację, o sfinansowaniu swoich badań w ramach projektu OPUS oraz opublikowaniu wcześniej uzyskanych wyników w dwóch publikacjach, w których jest pierwszym autorem. Obie prace znajdują się w czasopismach będących na Liście Filadelfijskiej; *Science of the Total Environment* ze wskaźnikiem cytowani 7.963 oraz *Industrial Crops and Products* z if 5.645, obie z 200 punktami ministerialnymi.

Następnie, w STRESZCZENIU w języku polskim i angielskim, w skrócie Doktorant przedstawił wprowadzenie do tematyki badawczej, główny cel pracy, kolejne jej etapy i wyniki.

Pan mgr Dariusz Kruszka zamieścił, co prawda niekompletny (np. brak jest skrótów: QuEChERS, FW, HBA, HCA, DM, a skrót NMR, opisany jako magnetyczny rezonans jądrowy, w tekście używany jest jako wysokorozdzielczy rezonans jądrowy), wykaz skrótów stosowanych w pracy, które ułatwiają poruszanie się po czytany tekście.

Niestety nie ułatwiła mi tego zastosowana do wydruku wielkość czcionki, która w opisach rysunków spadała tak bardzo, że przywodziła na myśl fragment wiersza autorstwa Jana Brzechwy – „...kupiła raz maczku paczkę, by pisać list drobnym maczkiem...”. Trudno

jest się skupić na treści, jeśli trzeba pokonywać barierę możliwości przeczytania. Drugi problem stanowiły rozbudowane zdania, zawierające po 4-5 orzeczeń, budowane bez interpunkcji – nie znalazłam ani jednego dwukropka, czy średnika.

W tematykę swoich zainteresowań naukowych Doktorant wprowadza czytelnika na 17 stronach WSTĘPU i tu wyjaśnia: zastosowanie nanocząstek w rolnictwie i biotechnologii, co to jest metabolomika i jakie metody analityczne są stosowane w tej dziedzinie badań, zastosowanie metabolomiki roślin w biologii systemów, podejście metabolomiczne w fitotoksykologii oraz zmiany metabolomiczne w roślinach pod wpływem nanocząstek. Ze WSTĘPU dowiadujemy się również, na jakich roślinach będą prowadzone prace badawcze, a mianowicie: na jednej z najlepiej przebadanych roślin leczniczych – dziurawcu zwyczajnym/ *Hypericum perforatum* L. oraz roślinie modelowej – rzodkiewniku pospolitym/ *Arabidopsis thaliana* L. Oprócz dwóch roślin mamy do czynienia z dwoma systemami *in vitro*: kultury komórkowe i siewki. I tu powstaje pierwsze moje pytanie – skąd pomysł na wykorzystanie różnych roślin i zróżnicowanych warunków hodowli?

Przedstawione przez Doktoranta CELE BADAWCZE zawierają: wstęp?, hipotezę badawczą, która brzmi - „nanocząstki metali i ich tlenków mogą być potencjalnymi elicytorami, które indukują akumulację metabolitów wtórnych w tym fitoaleksyn”, opis metodyki badawczej?, uzyskanych wyników? oraz dyskusję możliwości ich wykorzystania?, a także mocno rozbudowane, zakamuflowane cele, które z 1,5 strony tekstu można wyizolować następująco:

- poznanie charakteru zmian na poziomie metabolizmu pierwotnego i wtórnego, kultury komórkowej *Hypericum perforatum*, pod wpływem nanocząstek
- przeprowadzenie testów toksyczności szeregu nanocząstek
- określenie kierunku zmian w metabolomie ekstraktów z biomasy i medium hodowlanego
- ustalenie warunków elicytacji dla wytypowanych nanocząstek
- zbadanie mechanizmu hormonalnego, pośredniczącego w działaniu nanocząstek
- sprawdzenie wpływu nanocząstek Ag, na akumulację metabolitów wtórnych, w siewkach rośliny modelowej, w warunkach *in vitro*.

Z dotychczasowego opisu zwracają uwagę zwroty:

„rośnie też potencjalne ryzyko środowiskowe, jakie niesie za sobą zastosowanie nanomateriałów”

„szersze pokrycie metabolomu organizmu”

„zastosowanie kilku podejść analitycznych”

„pokrycie metabolomu w sposób ilościowy i jakościowy w trakcie jednego lub kilku toków analitycznych”

„Wzmożenie biosyntezy hyperycyny”

„nowoczesnej platformy jaką stanowi wysokorozdzielczy hybrydowy spektrometr masowy”

„szerokiego panelu metabolitów”.

W rozdziale MATERIAŁY I METODY Autor dysertacji zaznajamia nas z: materiałami zużywanymi do przygotowywania kultur komórkowych, stosowanymi nanocząstkami metali i tlenków metali, materiałami używanymi w analizach metabolomicznych, metodą pozyskiwania kultur komórkowych *H. perforatum*, opisem eksperymentu I, II i III, materiałem biologicznym i warunkami wzrostu *A. thaliana*, metodą traktowania nanocząstkami i jonami srebra, sposobem ekstrakcji kultur komórkowych i siewek, analizą UPLC-HESI-HRMS/MS biomasy kultur zawieszinowych *H. perforatum* i sposobem przetwarzania uzyskanych wyników, analizą UPLC-PDA-HESI-HRMS/MS biomasy siewek *A. thaliana* i przetwarzaniem danych, oznaczaniem zawartości kwasu absycynowego (ABA), jasmonowego (JA), i salicylowego (SA) metodą UHPLC-ESI-MS/MS (MRM), a także oznaczeniem poziomu kamaleksyny w siewkach *A. thaliana* za pomocą metody UPLC-FLR.

Po przeczytaniu tego rozdziału nasunęły mi się następujące pytania i uwagi:

Nanocząstki srebra występowały w 4 rozmiarach i pochodziły od dwóch producentów. Kiedy były stosowane jakie?

Czy wybór nanocząstek był przypadkowy?

Czy zauważono wpływ wielkości nanocząstek?

Tekst wstawiony na początku opisu eksperymentu III oraz opis rys 3.3 są błędne.

Czy ma znaczenie temperatura ekstrakcji siewek? Obniżona do ilu stopni?

W jaki sposób dokonywano wyboru wzorców wewnętrznych w ekstrakcjach?

Można zmierzyć pole powierzchni pików, ale nie da się zmierzyć pola powierzchni wierzchołka.

„Program elucji składał się z następujących kroków liniowego gradientu faz: 0 min – 0,5% B, 3 min – do 5% B, 10 min – do 15% B, 19 min – do 40% B, 23,5 min – do 95% B, 24 min – do 99% B, 26 min – powrót do 0.5% B.” Pyt. – A co między 11 a 12 min oraz 16 a 16,5 min.

Co to jest czas próbkowania?

Proszę o uzupełnienie: „...Następnie 50 mg suchej biomasy ekstrahowano za pomocą 500 μ l metanolu z dodatkiem 50 mieszaniny wzorców wewnętrznych...”

„Zastosowano następujący gradient faz: 0 min – 15% B, 3 min – do 30% B, 7,5 min – do 55% B, 8.5 – 10 min izokratycznie 99% B, 11 min powrót do 15% „, a co między 7,5 a 8,5 i 10 a 11 min.?”

W najbardziej obszernym rozdziale, na 57 stronach, Doktorant prezentuje WYNIKI. Mam dla mgr Kruszki duży szacunek, za wykonanie ogromu pracy przy identyfikacji, nie myląc z ustalaniem/określanem (determination), struktur 239 związków występujących w *H. perforatum* i 47 związków w *A. thaliana*. I to nie tylko przy opisanu metabolomu, ale także podczas stwierdzania zmian zawartości prawie 300 związków pod wpływem działania kilku nanocząstek, w różnych ich stężeniach i podczas różnych czasów działania. Wierzę, że otrzymane wyniki staną się przyczynkiem do powstania jeszcze niejednej, wspaniałej publikacji.

Kilka moich uwag rozpoczyna: brak w tekście odnośnika do rysunku 4.1.

Poprawna pisownia – naryngenina, a nie naringenina; z odłączeniem heksozy, a nie odejściem heksozy.

W zdaniu „Do 10 ml badanej zawiesiny komórkowej *H. perforatum* dodawano 25 μ l zawiesiny o stężeniu nanocząstek metali oraz tlenków metali.”, na str. 57, nie podano stężenia.

W jaki sposób „obliczono sumaryczny poziom metabolitów w każdej z grup fitochemicznych dla metabolizmu wtórnego”? (str. 59) Jaką metodą oznaczano zawartość związków?

Czy zawartość fitohormonów była oznaczana w stosunku do wzorców? (str.76)

Co to są znormalizowane pola powierzchni?

Równie istotną częścią tej pracy jest rozdział DYSKUSJA, w którym Doktorant z dużym zacięciem omówił wszystkie zidentyfikowane grupy związków, cytując z literatury

pierwszych odkrywców związków, bądź rośliny, w których wcześniej struktury tych związków były określone, bądź opisał aktywność biologiczną wspomnianych związków. Wyniki wszystkich innych badań wykonanych w tej pracy znalazły również poparcie literaturowe, a dzieje się to aż na 19 stronach. I tu tylko jedna moja uwaga – istnieje proces glikolizacji, a nie glikozydacji, a więc mówimy o glikolizowanych, a nie glikozydowanych flawonoidach (str. 100).

Dysertację kończą PODSUMOWANIA I WNIOSKI, gdzie mgr Kruszka zawarł krótkie podsumowanie i listę zwięźle sformułowanych, dziewięciu wniosków.

Reasumując stwierdzam, że praca mgr Dariusza Kruszki stanowi logiczną całość. Uzyskane podczas badań wyniki mogą w pełni stanowić przyczynek do wyjaśnienia zmian metabolomu *Arabidopsis thaliana* i *Hypericum perforatum* w odpowiedzi na oddziaływanie nanocząstek metali.

Przedstawiona do oceny praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, w związku z czym wnoszę o dopuszczenie Pana mgr Dariusza Kruszkę do publicznej obrony swojej pracy.

Puławy, 28 października 2022 r.

Prof. dr hab. Anna Stochmal