

Gdynia 27.12.2016

Dr hab. Waldemar Grzybowski prof. nadzw.

Instytut Oceanografii

Uniwersytet Gdański

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Doroty Zabłockiej

**Zmienność chromoforowych związków organicznych rozpuszczonych w wodach Bałtyku
badana metodami spektroskopii fluorescencyjnej.**

Przedstawiona mi do recenzji praca, dotyczy wykorzystania fluorometrii do opisu naturalnych substancji organicznych, rozpuszczonych w wodzie bałtyckiej. Autorka w swoich badaniach posłużyła się rozbudowaną wersją fluorometru, pozwalającą na rejestrowanie widm emisji przy różnych długościach fali wzbudzającej. Końcowy efekt pomiaru to zbiór widm emisji, który, uporządkowany wg długości fali wzbudzającej, tworzy widmo „trójwymiarowe” zwane macierzą widm wzbudzeniowo-emisyjnych (ang. EEMS). Widma te są obecnie powszechnie wykorzystywane w tak zwanym pół-jakościowym opisie chromoforowej rozpuszczonej materii organicznej (ang. CDOM). Z punktu widzenia chemika opis ten nie jest w pełni satysfakcjonujący, pozwala jednak na wykazanie różnic między materią w różnych wodach i/lub śledzenie zmian, jakim ona podlega. W omawianej zanalizowano widma fluorescencyjne przeszło tysiąca próbek wody bałtyckiej, pochodzących z wód przybrzeżnych i otwartych, zebranych w różnych porach roku. Poza fluorescencją rejestrowano dodatkowe parametry obejmujące absorbancję w zakresie UVVIS, zasolenie oraz stężenie chlorofilu a.

Recenzję zacznę od skomentowania tytułu sugerującego, iż omawiana jest tu zmienność fluorescencji. Praca dotyczy jednak składowych widm fluorescencyjnego uzyskanych poprzez matematyczną obróbkę widm zmierzonych spektrofluorymetrem. Doprecyzowano to w podrozdziale „Cele i zakres pracy”, gdzie mowa jest o „zidentyfikowanych głównych komponentach macierzy”. W podrozdziale tym Autorka wyczerpująco przedstawia aktualny stan wiedzy, wskazuje istniejące w niej luki i przekonująco uzasadnia celowość przeprowadzonych przez siebie badań.

Część zatytułowana „Wprowadzenie w problematykę zagadnienia” obejmuje niezwykle szeroki zakres tematów. W efekcie, w zbyt małym stopniu wprowadza w tematykę zagadnienia. Właściwe wprowadzenie znaleźć można w rozdziale 2 „Właściwości optyczne rozpuszczonych związków organicznych” zawierającym opis DOM (ang. Dissolved Organic Matter) i metod interpretowania widm fluorescencyjnych. Przy okazji uwaga ogólna: skróty HIX, BIX, SUVA, I_p , I_h i inne powinny być rozwinięte w miejscu, gdzie pojawiają się po raz pierwszy czyli w tym właśnie rozdziale. Rozdział o właściwościach optycznych jest również nadmiernie rozbudowany. Niejasna jest przydatność przedstawionych tu danych o rozmiarach zooplanktonu (rys 2.1), średnich stężeniach wagowych soli wchodzących w skład wody morskiej (Tab. 2.1) czy opisu problemów z analizą zdjęć satelitarnych (rozdział 2.2.6). Obok informacji „nadmiarowej” znajdujemy tu stwierdzenia, moim zdaniem, niewystarczająco uzasadnione i niejasne. Przykłady:

- „Kwasy fulwowe to związki alifatyczne, których „jądro” stanowi łańcuch alifatyczny o masie około 350 Da. Do łańcucha węglowego dołączone są cząsteczki fosfolipidów, aminokwasów, węglowodanów, kwasów tłuszczowych i mocznika”. Opis ten jest sprzeczny z rysunkiem 2.3. Nie udało mi się dotrzeć do cytowanej pracy Spitzzy i Ittekot (1986) i proszę Autorkę o wyjaśnienie sprzeczności.

- „Masa cząsteczkowa FA wynosi od 1 000 do 30 000 Da.” - z literatury przedmiotu wynika, iż jest to około 1000 Da

- „Cząsteczki rozpuszczonych chromoforowych związków organicznych zbudowane są z aminokwasów i białek, kwasów nukleinowych, mocznika oraz innych składników, głównie o niskiej masie molekularnej” Opis jest zaskakujący biorąc pod uwagę odporność CDOM na biodegradację. Co więcej, na stronie 34 autorka rozdziela „aminokwasy i ich pochodne, (...)” i „chromoforowe związki organiczne – CDOM?”.

- „Przeważająca część aminokwasów występuje w formie związanej, głównie, jako różne wiązki chinonów” „ligniny – złożone produkty biosyntezy węglowodorów, fenyloalaniny i tyrozyny”. Proszę o podanie źródeł tych stwierdzeń.

-Podrozdział 2.2.5. W grupie „rozpuszczonych związków organicznych mających wpływ na absorpcję światła” wyróżniono aminokwasy, puryny, ligniny i chromoforowe związki organiczne CDOM. Zwracam uwagę, iż CDOM to właśnie rozpuszczone w związkach organicznych mające wpływ na absorpcję światła.

-Czy „aminokwasy nasycone” to aminokwasy alifatyczne?

-Tabela 2.2: jak rozumieć np. liczbę 0, 19± 5, 22 opisującą współczynnik absorpcji?

Opis związku właściwości optycznych z właściwościami CDOM jest niewątpliwie przydatny, ale powinien być precyzyjniejszy. Autorka wykazuje, iż współczynniki nachylenia widma (ang. slope parameters) zależą od wybranego zakresu falowego, jednak cytując je w tabeli 2.5, nie podaje tego zakresu. Na stronie 50 czytamy: „Wzrost masy molekularnej zwiększa wartość współczynnika $S_{350-400}$ (Helms i inni, 2008 Cuéguen i Cuss, 2011)”. W obu przywołanych pracach jest jednak odwrotnie (odpowiednio fig. 5b i fig. 6b tamże). Czy Autorka ma na myśli współczynnik podawany ze znakiem minus?

W podrozdziale 2.2.5.1 opisującym absorpcję światła szeroko dyskutowane są tak zwane kwasy fulwowe i huminowe. Pojęcia te są jednak bez związku z prezentowanymi w tej pracy wynikami i nie pojawiają się w dyskusji. Warto pamiętać, że ich definicje mają charakter operacyjny: kwas huminowy to jest to, co się wytrąci po zakwaszeniu próbki. Ograniczoną wartość informacyjną ma też zaprezentowany w tej części „stopień fulwizacji akwenu”, który również pozostaje bez związku z tematem pracy i praktycznie nie występuje w literaturze przedmiotu.

Podrozdział 2.3 zawiera obszerne wprowadzenie do zjawiska fluorescencji, obejmujące elementy fizyki kwantowej i niezwykle szczegółową kategoryzację typów luminescencji (rys. 2.19). Część przedstawionych tu stwierdzeń wymaga, moim zdaniem, doprecyzowania:

-,energia emisji światła jest niższa lub równa energii absorpcji. (...) Jest to możliwe na skutek przekazana części energii, jaką atom lub cząsteczka uzyskały podczas wzbudzenia, innym cząsteczkom, (...). Zjawisko to nazwane zostało regułą Stokes’a”. Z rysunku 2.20 (diagram Jabłońskiego) wynika jednak, że przyczyną jest powrót elektronu z najniższego poziomu wzbudzenia elektronowego (reguła Kasy).

-Wydajność kwantowa jest poprawnie zdefiniowana, jako „stosunek ilości fotonów wyemitowanych do zaabsorbowanych”. Niejasne jest następujące stwierdzenie „wydajność kwantowa fluorescencji jest bliska jedności, lecz zawsze od niej mniejsza z uwagi na przesunięcie Stokes’a”. Cytowany Lakowicz pisze jednak o wydajności energetycznej: “the energy yield of fluorescence is always less than unity because of Stokes losses”.

-Proszę o doprecyzowanie i podanie źródła literaturowego do stwierdzenia „W środowisku wodnym wynosi ona zaledwie 0.1 %”.

-„Fluorescencja, dla której średni czas życia jest bliski 10 ns, jest procesem bardzo losowym”. Czy nie chodzi tu proces stochastyczny (ang. stochastic, random)? Jeśli tak, to stopniowanie tego określenia nie jest właściwe. Czy istnieje związek pomiędzy losowością procesu a jego „czasem życia”?

Akapit zaczynający się od słów „Dodatkowy wpływ na fluorescencję fluoroforów ma ich położenie względem siebie” opisuje rezonansowe przeniesienie energii. Zwracam uwagę, iż dotyczy ono również pary fluorofor i nie-fluorofor. Niejasne jest stwierdzenie, iż zmiany fluorescencji „są przewidywalne, tzn. zawsze takie same dla tej samej pary fluoroforów”. Z literatury przedmiotu wiadomo, że zmiany te zależą od odległości między „dawcą” a „odbiorcą” energii (niekoniecznie fluoroforem).

Mocną stroną rozdziału 2.3 jest przejrzysty i wyczerpujący opis fluoroforów w wodach morskich. Poniższe uwagi/kwestie mają charakter techniczny:

-Podrozdział 2.3.2 mógłby być rozdzielony między 2.3.3 i 2.3.

-Pigmenty (podrozdział 2.3.3) mogą być rozpuszczone i stanowić część frakcji rozpuszczonej opisanej w rozdziale 2.3.4

-„unormowanie do jedności w maksimach” widm aminokwasów na rys 2.23 uniemożliwia porównanie intensywności fluorescencji.

Omówienie fluorescencji aminokwasów byłoby ciekawsze gdyby uzupełniono je o dane środowiskowe, czyli informacje o aminokwasach w wodzie morskiej, ich stężeniach i oszacowanej na tej podstawie fluorescencji. Można byłoby w tym celu wykorzystać wydajność kwantową przedstawioną w tabeli 2.7.

Rozdział 3 „Materiały, metody i technika prowadzenia badań” jest po części nadmiernie rozbudowany a po części niewystarczający. Podrozdział 3.1 „Charakterystyka rejonu badań” zawiera opis Bałtyku obejmujący batyografię, reżim wiatrowy, lodowy, termikę, bilans wodny i stratyfikację. Byłoby to uzasadnione, gdyby dane te zostały wykorzystane w dalszej części pracy. Podrozdział 3.2 „Zmienność optycznych właściwości wód morskich w południowym Bałtyku” zawiera opis radiacji słonecznej, właściwości optycznych wody oparty na literaturze przedmiotu oraz dyskusję cytowanych danych. Uważam, że podrozdział ten nie powinien być w części „Materiały, metody”. Podobne zastrzeżenie dotyczy rozdziału 3.4 „Przegląd technik pomiarowych fluorescencji DOM w morzach i oceanach”. W tym miejscu proszę o wyjaśnienie następujących kwestii:

-Na stronach 80-81 dyskutowane są zmiany absorpcji na przestrzeni lat, w oparciu o histogramy (rysunki 3.3 I 3.4) zbioru pomiarów absorpcji. Czy zmiany te nie są wynikiem różnej liczby rejsów i lokalizacji poboru próbek

-Strony 79/80 „Najpełniejszy obraz (...) można uzyskać porównując wartości współczynnika absorpcji $a_{CDOM}(375)$ ”. Dlaczego więc „W niniejszej pracy (...) wybrano współczynnik absorpcji CDOM dla długości fali $\lambda=350$ nm, $a_{CDOM}(350)$ ”?

- Strona 82 „Dodatkowym źródłem CDOM w wodach Morza Bałtyckiego, o zasoleniu powyżej 7, jest jego produkcja przez fitoplankton i mikroorganizmy?(...). Proces ten jest statystycznie istotny w miesiącach lutym, maju i wrześniu, kiedy występuje (...) intensyfikacja aktywności biologicznej”. Z rys. 4.8c wynika jednak, iż najniższe stężenie chlorofilu zaobserwowano w lutym (najwyższe w kwietniu). Nie jest dla mnie jasne stwierdzenie, że proces jest statystycznie istotny. Proszę też o doprecyzowanie sformułowań „empiryczne liniowe natężenie fluorescencji” oraz, że coś „ rośnie nieproporcjonalnie wraz ze wzrostem zasolenia”.

Podrozdział 3.3 „Zakres prac terenowych i metodyka poboru i analizy próbek” w dużej mierze spełnia oczekiwania czytelnika, jednak parę kwestii należałoby wyjaśnić. Autorka wielokrotnie stosuje nazwę Bałtyk Właściwy, który, według opisu, obejmuje min. ujście Wisły i Zalew Szczeciński. Stacje pomiarowe (rys 3.5) obejmowały bardzo dużą część Bałtyku. Co zatem nie jest Bałtykiem Właściwym? Poniżej uwagi/pytania/komentarze szczegółowe:

-Filtr Whatman GFF ma średnicę porów $\sim 0,7-0,8 \mu\text{m}$.

-Transmitancję zdefiniowano, jako „stosunek natężenia światła rejestrowanego przez detektor po przejściu przez kuwetę z próbką, *ID*, względem natężenia źródła światła„. Różni się to od typowej definicji uwzględniającej natężenie źródła światła, które przeszło przez kuwetę z wodą destylowaną.

-„Współczynniki nachylenia widma absorpcji światła przez CDOM – S300-600, zostały wyliczone (...) w zakresie spektralnym od 300 do 600 nm”. Według opisu pozwoliło to „zredukować możliwy wpływ obecności lignin (...) których obecność objawia się w zakresie 260–310 nm”. W pracy znajdujemy jednak wyniki z zakresu 250-700 nm (rys 2.12). Czy są obciążone błędem wynikającym z wpływu lignin?

Z mojego doświadczenia wynika, iż absorpcja wód Bałtyku w zakresie długofalowym jest bardzo niska i nawet w kuwecie 10 cm zbliża się do tak zwanego szumu aparaturowego. W jakich kuwetach wykonano pomiary? Jaka była granica oznaczalności w zakresie długofalowym? Jak była precyzja (powtarzalność) pomiaru? Jaki był wpływ filtra celulozowego?

W rozdziale 3.5 omówione zostały sposoby prezentowania wielkości fluorescencji. Dowiadujemy się o normalizowaniu względem widma ramanowskiego wody destylowanej oraz że „dodatkowo (...) stosuje się skalowanie (...) względem wzorca”. Nie udało mi się znaleźć wyjaśnienia, którego sposobu użyto w tej pracy. Co oznacza skrót A.U. na osiach y na jednych i R.U. na innych rysunkach? Zakładając, że chodzi o Raman unit (w literaturze występuje też relative unit) mam następujące pytania:

-Jak powtarzalne były pomiary fluorescencji wód naturalnych oraz wody destylowanej? Na którym miejscu po przecinku pojawiły się rozbieżności w pomiarach replikatów?

-Wyniki (będące prawdopodobnie ilorazem fluorescencji i rozpraszania ramanowskiego) podawane są z trzema miejscami po przecinku. Jak oszacowano precyzję tego ilorazu?

-Strona 91: Wyniki „poddano przygotowawczym etapom korekcji i kalibracji danych szczegółowo opisanych w Rozdziale 3.4.” Rozdział 3.4 nie zawiera takiego opisu (również ten rozdział również nie powinien znaleźć się w części „Materiały, metody”).

-Pomiar emisji próbek wody wykonywano w zakresie falowym z górną granicą 600 nm. Wykluczyło to możliwość zaobserwowania fluorescencji chlorofilu. Jaki był powód przyjęcia tej granicy?

Rozdział 3.5 zawiera teoretyczne podstawy korygowania widm fluorescencji. W tej części oczekiwałbym następujących informacji:

- Jaka część zbioru próbek wymagała korekty na „inner filter effect”? Jakie było kryterium jej stosowania? Jak duże były te poprawki? W jakim zakresie falowym?

-,„sprzętowy” współczynnik (poprawka) w zakresie krótkofalowym sięgał 10 (rys 3.10). Oznacza to, że zmierzona fluorescencja wymagała skorygowania o prawie rząd wielkości. Jak to, zdaniem autorki, mogło wpłynąć na dokładność prezentowanych danych?

Rozdział 3.6 zawiera opis matematycznego rozkładania widma na składowe (PARAFAC). Metoda jest tu klarownie przedstawiona i dzięki przedstawieniu założeń czytelnik jest świadomy jej ograniczeń (przy okazji proszę o wyjaśnienie rys 3.14: czy następuje tu mieszanie próbek?). Pytania dotyczące tej części są następujące:

-Jak rozumieć następujące stwierdzenie: „wpływ niektórych czynników, takich jak samozacienianie się próbki czy zmiany temperatury, może być zminimalizowany, ale nie jest możliwym wyeliminowanie wpływu na pomiar wszystkich czynników”?

-Założenie, iż „nie istnieją dwa różne chemicznie związki o takich samych widmach absorpcji czy emisji światła” jest słuszne w przypadku roztworów związków chemicznych. Rozpuszczona materia organiczna (DOM) jest jednak mieszaniną o nieznanym składzie i stężeniu. Czy można wykluczyć istnienie DOM o podobnych widmach absorpcji czy emisji, lecz różniących się składem?

- „fluorescencja mieszaniny składników jest wynikiem liniowej superpozycji fluorescencji poszczególnych substancji składowych”. Jest słuszne dla substancji niereagujących ze sobą. Czy można wykluczyć sytuację, w której składniki DOM łączą się/reagują ze sobą przy mieszaniu różnych wód? Jaki to może mieć wpływ na modelowanie PARAFAC?

Autorka klarownie opisała sposób oceny poprawności uzyskanego modelu, jednak praca nie zawiera wyników tej oceny (wg rys 3.15 walidacja modelu jest integralną częścią metody PARAFAC). Rysunek 3.17 przedstawia tylko przykład/ilustrację takiej walidacji. W trakcie publicznej obrony oczekiwałbym doprecyzowania następujących kwestii:

- W jakim stopniu model 6 składnikowy okazał się lepszy od modeli o innej liczbie składowych? Oczekiwałbym kilku reprezentatywnych widm „szumów” takich jak na rys. 3.17(a-b). Inny sposób zilustrowania jakości modelu pokazano w cytowanej przez Autorkę pracy Stedmon i Markager 2005a. (rys. 4 tamże).

-W jakim stopniu zastosowany model jest uniwersalny? Zakres analizowanych wód był bardzo szeroki. Czy wszędzie model 6 składnikowy był najlepszy? Opublikowane prace dotyczące Bałtyku różnią się liczbą składowych.

Rozdział 4 zawiera sedno pracy a mianowicie widma 6 składników uzyskanych z matematycznego „rozłożenia” rzeczywistych widm próbek wód. Czy nie byłoby celowe pokazanie tu kilku rzeczywistych widm fluorescencyjnych? Część zatytułowana „Wyniki analizy PARAFAC” zdominowana jest przez omawianie literatury przedmiotu. Uważam, że powinno to znaleźć się w części teoretycznej. Autorka przeprowadziła bardzo staranną kwerendę literaturową, z której wynika, że ten sam składnik zaobserwowano w próbkach z oczyszczalni ścieków, stacji uzdatniania wody, wodach arktycznych, jeziorach, rzekach i mokradłach strefy borealnej. Pojawia się pytanie czy składnik jest wszechobecny, czy metoda niespecyficzna. Jestem ciekaw opinii Autorki. Przy okazji zwracam uwagę na pracę Parlanti et al. (Organic Geochemistry 31, 2000, 1765-1781), w której biodegradacja alg w wodzie destylowanej doprowadziła do powstania składnika (rys 13 B tamże) odpowiadającemu C2 w tej pracy. Składnik ten, według cytowanej literatury przedmiotu, jest jednak „mieszaniną substancji humusowych pochodzenia lądowego” lub „mieszaniną związków powstałych prawdopodobnie poprzez utlenianie chinonów”.

Podrozdziały 4.1.1 I 4.1.2 zawierają opis uzyskanych danych i rola recenzenta jest tu bardzo ograniczona. Oczekiwałbym tylko wyjaśnienia kilku kwestii:

-Jak uzyskano całkowitą fluorescencję (rys 4.6)? Czy jest to suma fluorescencji w maximach? Jeśli tak, to jak precyzyjnie je zlokalizowano?

- Stedmon i Markager (2005a) przedstawiają model składowych bałtyckiej FDOM (rys. 5 tamże), gdzie wartości fluorescencji (w tych samych jednostkach) są o rząd wielkości niższe. Jak to wyjaśnić?

-Co przemawiało za prezentowaniem median i kwantyli a nie wartości średnich i odchylenia standardowego? Przy „wzrokowym” szacowaniu istotności statystycznej różnic te drugie wskaźniki są bardziej przydatne. Dane są, co prawda, w tabelach, ale korzystanie z nich w tej formie jest trudniejsze

-Rys. 4.19 przedstawia parametr SUVA wymagający oznaczenia DOC (ang. Dissolved Organic Carbon). W części Materiały i metody brak jest jakiegokolwiek wzmianki na temat tej analizy. Proszę o dane na temat metody pomiaru, powtarzalności, wpływu filtracji filtrem celulozowym. I pozostając przy temacie: czy Autorka zaobserwowała jakąś zależność pomiędzy stężeniem materii organicznej a fluorescencją?

Rozdział 5 „Ilościowa i jakościowa zmienność FDOM w Morzu Bałtyckim” zawiera najciekawsze, moim zdaniem, zestawienia składowych uzyskanych z modelu z właściwościami badanych wód. Przedstawione tu rysunki ilustrują uzyskane zależności, ale ich analiza wymaga sporego skupienia. Autorka starała się przedstawić je w sposób skompresowany i zależności trzech zmiennych na płaszczyźnie pokazała posiłkując się kolorem. Uważam, że lepiej byłoby użyć koloru do pokazania mniej istotnej (wtórnej) zmiennej. Zmiany w funkcji zasolenia/głębokości/chlorofilu są, moim zdaniem, ciekawsze od zmian względem $a(350 \text{ nm.})$ czy HIX. Stąd też proszę o pokazanie w prezentacji zależności składowych C4 i C6 (hipotetycznie pochodzenia mikrobiologicznego) od stężenia chlorofilu a.

W rozdziale 5 pojawiają się współczynniki nachylenia widma (rys 5.10, 5.11) uzyskane dla zakresu falowego 300-600 nm. Jak dobrze funkcja wykładnicza odzwierciedla rzeczywiste widma absorpcyjne (jaki był współczynnik determinacji)? W tej części rozprawy Autorka nieco na wyrost stosuje określenie „substancje białkowe”. Efekty są dla niewprowadzonego w temat czytelnika zaskakujące: „fitoplankton produkuje głównie komponenty białkowe”. Zarówno w tej pracy ani w żadnej z zacytowanych nie przeprowadzono analiz chemicznych DOM. Jedyne, co wiemy to to, że dyskutowane substancje fluoryzują w sposób podobny do aminokwasów aromatycznych. Cytowani autorzy używają, co prawda, określeń „tryptophan-like” „protein-

like”, w zdecydowanej jednak większości bez analiz składu chemicznego.

Na podkreślenie w tym rozdziale zasługuje dyskusja wyników prowadzona przez Autorkę. Nie ogranicza się ona do omówienia korelacji pomiędzy parametrami, ale proponuje wyjaśnienia/hipotezy dotyczące zaobserwowanych zależności. Te z kolei, oparte są zarówno na dobrej znajomości literatury jak i procesów przebiegających w badanym obszarze. Waga prezentowanych wniosków w dużej mierze wynika z poszerzenia zakresu analiz o dodatkowe charakterystyki badanych próbek wody (zasolenie, chlorofil). Daje to, moim zdaniem, znaczącą przewagę tej rozprawie nad publikacjami, w których dyskusja zawężona jest do właściwości optycznych.

Rozdział 6 Podsumowanie i wnioski zawiera kolejny przegląd literatury (str. 195 i 196), pozostający w bardzo luźnym związku z zaprezentowanymi wynikami. W jego dalszej części Autorka skupia się na zmienności sezonowej (tu zwracam uwagę na ciekawą obserwację zmian w stosunku do sytuacji sprzed kilkunastu lat) oraz omawia wpływ dynamiki wód w oparciu o zasolenie. Bardzo wartościowe jest tu wykazanie ograniczonej przydatności wskaźnika BIX: „W toku analizy stwierdzono, że index BIX charakteryzuje się niewielką zmiennością przestrzenną i sezonową”. Warto zwrócić uwagę, iż twórcy tego wskaźnika (Huguet et al 2009) wprowadzili go bez jakichkolwiek analiz bezpośrednio wskazujących na „autochthonous biological activity”. Czy nie lepiej byłoby zatem posłużyć się bezpośrednim wskaźnikiem „biologiczności”, czyli stężeniem chlorofilu a przedstawionym na rysunku 4.8 c?

W jednym ze wniosków czytamy, iż „natężenie fluorescencji substancji proteinowych (...) wzrasta wraz z oddalaniem się od źródeł wody słodkiej i najwyższe jest w wodach otwartych Morza Bałtyckiego”. Z danych w tabeli 4.6 wynika, iż średnie wartości składowych C4 i C6 w wodach zatokowych i przybrzeżnych (WZP) w większości przypadków były wyższe niż w wodach otwartych (WO). Skąd ta rozbieżność? Czy nie chodzi tu o udział tych komponentów w fluorescencji a nie natężenie fluorescencji? Przy omawianiu masy cząsteczkowej, aromatyczności czy alifatyczności fluoroforów celowe byłoby zacytowanie publikacji, na których Autorka oparła swoje hipotezy.

W podsumowaniu Autorka przedstawia syntezę poczynionych przez siebie obserwacji oraz wnioski. Uważam, że można byłoby je poszerzyć o wstępne chociaż zweryfikowanie hipotezy o mikrobiologicznym pochodzeniu składowych C4 i C6. Praca Autorki, jako jedna z nielicznych, zawiera obserwacje sezonowych zmian tych składowych wraz z towarzyszącymi im

danymi na temat chlorofilu. Czy, zdaniem Autorki, można coś w tej kwestii stwierdzić? Kontynuując wątek interpretowania pozyskanych wyników zwracam uwagę na niewykorzystane dane z sondy STD. Czy nie celowe byłoby zbadanie wpływu stratyfikacji? Z opisu na stronach 77-78 wynika, iż uwarstwienie Bałtyku ma duży wpływ na właściwości optyczne.

W ostatnim akapicie pracy podkreślono wyjątkowość obiektu badań (wód Bałtyku), wynikającą z wysokich wartości i dużego zróżnicowania fluorescencji, oraz zasugerowano potencjalnym następcom tematy warte rozwinięcia.

Cytowana w pracy literatura naukowa jest obszerna i aktualna. Nie mam zastrzeżeń do sposobu prezentowania danych bibliograficznych artykułów naukowych. Książki, rozdziały w książkach powinny być jednak prezentowane w sposób ujednolicony. Praca została starannie sprawdzona, błędy typograficzne są nieliczne.

Podsumowując, uważam, że praca jest interesująca i ma walor nowości naukowej. Zaprezentowane dane z pewnością mogą być wykorzystane w publikacjach z zakresu modelowania PARAFAC. Jestem przekonany, że przedstawione w recenzji kwestie/wątpliwości zostaną wyjaśnione w trakcie publicznej obrony. Stwierdzam, iż przedłożony mi do recenzji maszynopis pracy autorstwa magister Moniki Doroty Zalewskiej spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim. Wniosuję o dopuszczenie Autorki do dalszego postępowania zmierzającego do nadania stopnia doktora.

Waldemar Gajda