

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Ziętarey
„Impact of temperature, zinc contamination and mesofauna on soil microbial community structure and functioning”.

Ocena ogólna

Praca doktorska Pani mgr Joanny Ziętarey przygotowana pod opieką prof. dr hab. Ryszarda Laskowskiego stanowi wyjątkowo obszerną, napisaną w języku angielskim monografię dotyczącą skutków oddziaływania cynku w różnych temperaturach na procesy i organizmy glebowe. Tematyka pracy stanowi o jej ekotoksykologicznym (metal, temperatura jako czynniki stresu) i ekologicznym (łańcuchy troficzne, procesy glebowe, różnorodność) charakterze.

Prawidłowe funkcjonowanie ekosystemów glebowych determinuje obieg pierwiastków i przepływ energii w biosferze. W procesach tych decydującą rolę odgrywają organizmy glebowe z różnych poziomów troficznych, w tym przede wszystkim mikroorganizmy oraz mezo i makrofauna glebowa. Struktura i funkcjonowanie zespołów mikroorganizmów glebowych są zależne od wielu biotycznych i abiotycznych czynników i ich wzajemnych interakcji. Znajduje to odzwierciedlenie w licznych pracach badawczych, dowodzących wpływu różnorodnych najczęściej jednak pojedynczych czynników na przebieg procesów glebowych, zależności troficznych czy też zmian w parametrach mikrobiologicznych.

Przeprowadzone badania miały na celu oszacowanie wpływu zanieczyszczenia naturalnej gleby leśnej stosunkowo niewysokim stężeniem cynku (500 mg/kg) dodanego do gleby inkubowanej w laboratoryjnych warunkach w trzech różnych temperaturach (10°C, 20°C, 24°C), w obecności lub bez przedstawicieli fauny glebowej, na aktywność i profile fizjologiczne zespołów mikroorganizmów glebowych. W opisie celów znajdujemy także plany analizy stabilności łańcuchów troficznych mezofauny, dekompozycji materii organicznej i przemian azotu. Zaproponowany przez doktorantkę kompleksowy, wieloczynnikowy układ eksperymentalny zakładający istnienie interakcji pomiędzy biologicznymi i abiotycznymi czynnikami oparty o badania wazonowe, rozbudowany dodatkowo o analizę skutków

działania tych czynników w czasie stanowi o oryginalności pracy i w tym kontekście przeprowadzone badania dobrze wpisują się w nurt aktualnych badań ekotoksykologicznych.

Ocena merytoryczna

Rozprawa doktorska p. Ziętary jest nad wyraz obszerna, wraz z 69 rycinami i ponad 40 tabelami zajmuje 180 stron. Zawarty na 30 stronach „Wstęp” jest bardzo szczegółowym przeglądem wiedzy dotyczącej różnorodności organizmów glebowych, ich roli w procesach glebowych oraz skutków oddziaływania czynników antropogenicznych i naturalnych. Dodam, że w opisie zamieszczone zostały wyniki badań dotyczące nie tylko analizowanych przez doktorantkę parametrów gleb ekosystemów leśnych. Opierając się na licznie cytowanej literaturze Autorka dowodzi, że pomimo wykazywania istotnych zależności pomiędzy różnorodnością organizmów glebowych i funkcjonowaniem ekosystemów lądowych nadal wiedza na ten temat jest ograniczona, podkreślając niedostateczny stopień rozpoznania ekologicznych skutków wspólnego działania kilku czynników. Poza informacjami dotyczącymi funkcjonowania ekosystemów glebowych w warunkach różnych zanieczyszczeń we wstępie znajdujemy także szczegółowy opis licznych metod dotyczących badania struktury zespołów mikroorganizmów, także nie stosowanych przez Doktorantkę w pracy. Wobec dojrzałego, bardzo szczegółowego wstępu dotyczącego wpływu całej gamy czynników na procesy glebowe i organizmy bytujące w glebach dziwi brak sformułowanych przez doktorantkę hipotez badawczych, zarówno w aspekcie działania pojedynczych czynników jak i interakcji. Przy tak obszernym wstępie za dość pobieżnie należy uznać określone cele sugerujące zbadanie wpływu cynku i temperatury na stabilność utworzonych uproszczonych łańcuchów troficznych oraz na różne procesy glebowe w tym dekompozycję. Niestety, jak czytamy w pracy, ekstynkcja niektórych gatunków mezofauny wprowadzonej do mezokosmosów rozpoczęła się już po pierwszym miesiącu eksperymentu, co wyeliminowało główny czynnik biologiczny i znacznie utrudniło interpretację uzyskanych wyników. Istotnym uchybieniem jest także brak w dysertacji streszczenia, zarówno w języku polskim jak i angielskim.

Podzielony logicznie na 5 podrozdziałów rozdział „Materiały i Metody” zawiera szczegółowy opis schematu zaplanowanego doświadczenia, czasochłonnego przygotowania 144 otwartych mezokosmosów, w tym 72 z próbami gleby potraktowanymi rozpuszczalnym chlorkiem cynku o stężeniu 500 mg Zn na kg sm gleby, co stanowiło o utworzeniu dwóch grup: kontrolnej i zanieczyszczonej cynkiem. W rozdziale znajdujemy też informacje o

zaszczepieniu do wyjąłowanej gleby odpowiednio uzyskanych, ekstrahowanych z gleby leśnej mikroorganizmów, oraz wprowadzeniu do połowy mezokosmosów (72 sztuk) czterech gatunków wybranych gatunków mezofauny: jednego drapieżnego gatunku roztocza oraz dwóch gatunków skoczogonków i roztocza *Rhizoglyphus robinii* jako gatunków ofiar. Dobór stężenia cynku oraz temperatur jest sensownie i jasno wytłumaczony. W planowanym modelowym eksperymencie biologicznym czynnikiem miał być udział mezofauny. Niestety z powodów wspomnianych powyżej doktorantka natrafiła na poważne problemy.

Istotnym uchybieniem rozdziału "Materiał i metody" jest brak opisu metod statystycznych, choć znajomość i umiejętność ich stosowania których potwierdziła doktorantka w analizach, wykresach oraz w dyskusji.

Pomimo szczegółowego opisu materiału i metod rozdział budzi moje wątpliwości. Proszę o ustosunkowanie się do poniższych pytań i komentarzy:

1. W opisie brakuje podstawowych informacji dotyczących pobrania gleby: głębokości (warstwy-poziomu) gleby, istotnej dla zawartości materii organicznej a tym samym organizmów w niej występujących. Nie wiadomo, w ilu punktach i kiedy pobrano próby gleby, jak długo były przechowywane zanim przystąpiono do doświadczeń. Dla skonstruowania 144 mezokosmosów ilość zebranej gleby musiała być znaczna, co więc składało się na tę mieszaną, jednorodną próbę gleby?
2. Czy próby gleby w mezokosmosach standaryzowane były ostatecznie do wilgotności 50%WHC (jak czytamy na stronie 37) czy do 75% WHC (str.39). Jaka była wartość maksymalnej pojemności wodnej gleby? Ilu gramom suchej masy gleby odpowiadały próby gleby w mezokosmosach?
3. Przeprowadzona zamierzona standaryzacja odczynu gleby dla wyeliminowania wpływu tego czynnika, poprzez dodatek CaCO_3 stanowiący 8 czy 18% w wilgotnej glebie, odpowiednio dla prób kontrolnych i zanieczyszczonych Zn mniej lub bardziej zredukowała zawartość materii organicznej, zmieniając z jednej strony biomasę mikroorganizmów glebowych a z drugiej strony zwiększając ilość całkowitego węgla w badanych próbach. Zmiana odczynu gleby o prawie 2 jednostki zapewne spowodowała też na wstępie zmiany w zespołach mikroorganizmów gleby leśnej, dla której naturalnym odczynem jest odczyn kwaśny.

4. Czy wśród pierwiastków oznaczanych w glebie był kadm (str. 39) czy miedź (str.43)?
5. Dlaczego tylko tempo respiracji było mierzone 5 krotnie, w tym na początku doświadczenia a pozostałe zmienne dopiero po 1, 2, 3, i 4 miesiącach, pomimo informacji na stronie 36 o pięciu seriach pomiarowych dla każdego badanego parametru.
6. Proszę o wytłumaczenie z czego wynika przeprowadzenie analizy testów Biolog, w jednej temperaturze (22°C) dla oszacowania zmian w strukturze zespołów mikroorganizmów inkubowanych od 1 do 4 miesięcy w trzech różnych temperaturach. Czy tak przeprowadzone analizy odpowiadają na stawiane pytania? Czy podstawą były znane z literatury wyniki?

W rozdziale „Wyniki” Doktorantka szczegółowo przedstawiła w tekście, tabelach i na wykresach prawie wszystkie uzyskane wyniki, nawet te dla których nie stwierdzono istotnych zależności. Tekst opisujący wyniki zajmujący ponad 20 stron, uzupełniony jest 8 tabelami z wartościami średnimi badanych zmiennych i 30 tabelami z wynikami przeprowadzonych analiz statystycznych. Wyniki dotyczące zawartości materii organicznej, stężenia C i N w badanych blokach eksperymentalnych zostały podane tylko dla serii pomiarowej w czasie 0 i po 4 miesiącach, co utrudnia ich interpretację. Trudne do wytłumaczenia są wzrastające w czasie stężenia procentowe węgla i azotu, nawet o 3.7 % dla C i 0.38 % dla N przy obserwowanych wartościach malejącej w czasie zawartości materii organicznej. Nie wiemy, czy mierzone w różnych temperaturach i zmienne w czasie tempo respiracji korelowało z aktywnością bakterii lub grzybów szacowaną testami Biolog®. Jak sugeruje Autorka niespodziewana ekstynkcja przedstawicieli mezofauny była powodem rezygnacji z planowanej oceny zmian w liczebności poszczególnych gatunków, mającej odzwierciedlać stabilność łańcuchów troficznych.

Za istotne i cenne uważam zastosowanie dwóch typów testów Biolog® umożliwiających śledzenie zmian w profilach fizjologicznych bakterii i grzybów, o których to grzybach wiadomo że są znacznie mniej wrażliwe na działanie metali, w tym w szczególności cynku. Tytuł pracy sugeruje badanie zmian w strukturze zespołów mikroorganizmów. Niektórzy badacze faktycznie używają określenia „struktura” dla badania i porównywania profili fizjologicznych mikroorganizmów, ale od dawna do badania struktury stosuje się metody analizy kwasów tłuszczowych (PLFA < FAME) czy ostatnio najczęściej stosowane metody molekularne. Szkoda, że analizując profile fizjologiczne doktorantka nie pokusiła się o przeprowadzenie analizy gildii, rozkładu grup substratów zawartych w płytkach ECO i FF.

Analiza ta pozwala na lepsze oszacowanie funkcjonowania zespołów mikroorganizmów i stosowana jest do oceny zmian i porównywania struktury zespołów mikroorganizmów glebowych. W mojej opinii uzyskane w kolejnych seriach pomiarowych wyniki różnych form azotu mineralnego w glebie powinny posłużyć do oszacowania zmian tempa mineralizacji azotu, co dobrze wpisywało by się w sugerowane w tytule pracy funkcjonowanie zespołów mikroorganizmów i ekosystemów glebowych.

Dyskusja jest dojrzałą, dogłębną próbą wy tłumaczenia olbrzymiej liczby otrzymanych wyników, chociaż zabrakło w niej próby wy tłumaczenia wskazanych powyżej (w punktach 3 i 5 komentarzy) i nasuwających się wątpliwości. Najwięcej miejsca poświęciła Autorka analizie wyników mierzonego tempa respiracji, uwzględniając co istotne zmiany w dostępności łatwo rozkładających się frakcji materii organicznej oraz istotny udział mezofauny, w szczególności w glebie zanieczyszczonej cynkiem. Wyniki sugerują, że obecność mezofauny i jej odchody, stymulują rozkład materii organicznej. Otrzymane wyniki parametrów mikrobiologicznych mierzonych testami Biolog ® wskazują na dodatni wpływ podwyższonego stężenia cynku w glebie szczególnie na aktywność bakterii, w mniejszym stopniu grzybów, przy odmiennych reakcjach wskaźnika różnorodności grzybów w mezokosmosach z udziałem i bez udziału fauny glebowej. Wyniki dotyczące zmian w różnorodności funkcjonalnej bakterii i grzybów są znacznie słabiej dyskutowane. Ogólnie, przeprowadzone doświadczenie dowodzi istotności różnego stopnia interakcji badanych czynników. Część trudnych do wy tłumaczenia wyników budzących wątpliwości samej Autorki pozostaje bez wy tłumaczenia. Mimo to, w mojej ocenie przeprowadzona dyskusja świadczy o dobrym merytorycznym przygotowaniu Doktorantki do prowadzenia pracy naukowej. Wyprowadzone w oparciu o uzyskane wyniki wnioski stanowią konsekwencję wnikliwej analizy problemu badawczego.

Zauważone w tekście, niewymagające dyskusji błędy to:

1. W podpisach pod rycinami od 16 do 19 napisano po 4 dniach, powinno być po 4 miesiącach
2. Stężenia Zn jako zmiennej niezależnej przedstawione są na osi odwrotnie , bliżej osi Y stężenie 500 mg/ kg a dalej kontrola czyli 22 mg/kg.
3. Brak kilku cytowań, szczególnie publikacji „ z drugiej ręki”.
4. Błędnie pisane słowa „treatment”, „presented” (np. w uzupełnieniach pod tabelami)

5. Brak w tytułach wykresów analizy wariancji danych o liczbie analizowanych każdorazowo prób, przydatnych przy tak licznych i różnorodnych zestawach analizowanych danych.

Uwagi końcowe

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca stanowi oryginalne osiągnięcie naukowe. Zaplanowanie tak kompleksowego układu doświadczalnego było bardzo ambitnym, wymagającym dużego nakładu pracy zadaniem, a przedstawione cele badawcze były wynikiem dobrej znajomości światowej literatury przedmiotu i aktualnych trendów w badaniach ekotoksykologicznych. Doktorantka wykazała, że zna i potrafi zastosować różne metody analityczne i poprawnie przeprowadza analizy statystyczne. W dyskusji odnosi się krytycznie do uzyskanych wyników, dowodząc dojrzałości naukowej i poprawnego stosowania języka naukowego.

Pomimo wielu wskazanych uchybień praca wnosi pewne elementy nowatorskie do problemów związanych z oddziaływaniem substancji toksycznych w różnych warunkach środowiskowych. Wykazanie istotnych interakcji badanych czynników (Zn, temperatury, mezofauny i czasu) na zespoły organizmów glebowych i funkcje ekosystemów glebowych (mineralizacja węgla i azotu) dają podstawy do prowadzenia dalszych tego typu badań.

Na tej podstawie stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Joanny Ziętary spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim i określone w artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki wraz z późniejszymi zmianami i wnioskuję do Wysockiej Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Joanny Ziętary do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Maria Niklińska