

Prof. em. dr hab. Paweł Migula
Katedra Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii
Uniwersytet Śląski w Katowicach

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Joanny Ziętarey:

"Impact of temperature, zinc contamination and mesofauna on soil microbial community structure and functioning – a microcosm study "

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska mieści się dobrze w zakresie badań ekotoksykologicznych prowadzonych w celu dalszego wyjaśniania złożonych zależności funkcjonalnych w tak wrażliwym systemie jakim jest środowisko glebowe. Praca doktorantki dostarcza kolejnych informacji, które przybliżają rozumienie wzajemnych, złożonych relacji między różnymi biotycznymi i abiotycznymi czynnikami wymienionymi w tytule. Zależnie od intensyfikacji działania, mogą one oddziaływać jako silne stresory zaburzające biotyczne składowe systemu glebowego.

Autorka dobrze rozumie złożoność i różnorodność zjawisk zachodzących w ekosystemach glebowych, szczególnie w warunkach kiedy są one od wielu lat poddawane stresowi chemicznemu, do czego w znacznej mierze przyczynia się wieloraka działalność człowieka. Świadczy o tym treść zawarta w kilku podrozdziałach *Wstępu* rozprawy. Ważność tych procesów popiera przytaczając między innymi wyniki badań uzyskanych w ramach zintegrowanych programów międzynarodowych. Przedstawia, jak znacząco rozwinęły się w ostatnich dziesięcioleciach badania naukowe ukierunkowane na problematykę bioróżnorodności organizmów zasiedlających środowiska glebowe, w szczególności dotyczące zespołów mikroorganizmów. Autorka wzmiankuje o tym cytując edytorów książki *"Biological Diversity and Function in Soils"*, (Bardgett et al., eds., Cambridge Univ. Press, 2005). We wstępie piszą oni: *"Soil has generally been regarded as something of a 'black box' by ecologists"* - ale dodają, że *"Recent technical developments, including isotopic and molecular methods as well as new experimental and modelling approaches, have led to a renaissance in soil biodiversity research"*. Dokumentują to wyniki badań w artykułach zamieszczonych w wymienionej monografii.

Autorka umocowała swoje badania w silnie rozwijającym się w obecnym wieku kierunku wyjaśniającym oddziaływanie wielorakich stresorów środowiskowych. Za przykład podaje wieloletni program badawczy EU o akronimie NoMiracle – (*Novel methods for integrated risk assessment of cumulative stressors in Europe*), w którym, pod kierunkiem prof. dr hab. Ryszarda Laskowskiego, aktywnie uczestniczył zespół badaczy z Instytutu Nauk o Środowisku UJ.

W opinii recenzenta przedstawiona praca spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane pracom doktorskim. Tytuł pracy uważam za adekwatny do treści zawartej w rozprawie i towarzyszącej jej

dokumentacji graficznej i tabelarycznej. Praca jest napisana poprawnym językiem angielskim, w czytelnej formie, choć jest przesadnie rozbudowana, zarówno co do treści jak i dokumentacji uzyskanych wyników. Autorka zachowała formę rozprawy przyjmowaną, a nawet wymaganą, w większości znaczących czasopism naukowych z dziedziny nauk przyrodniczych, prezentujących wyniki badań eksperymentalnych. Zachowała spójność rozdziałów, co umożliwia śledzenie wywodów autorki zawartych w części wstępnej zakończonej krótkim przedstawieniem zasadniczych celów pracy i dalej: opisie doświadczenia i zastosowanych metod badawczych, wyników, dyskusji, wniosków i spisie cytowanego piśmiennictwa. Tekstowi liczącemu 107 stron towarzyszy 69 wykresów i 36 tabel, często dwuczęściowych, zawierających dane źródłowe oraz dobrze opracowane wyniki analiz statystycznych. Mimo znacznej objętości pracy zabrakło w niej bardziej szczegółowego uzasadnienia celów pracy, jasnego postawienia hipotez badawczych a także streszczenia rozprawy.

Autorka przyjęła założenie, że w warunkach terenowych wzajemne interakcje między organizmami z środowiska glebowego i ich oddziaływania modyfikujące fizyczne i chemiczne właściwości gleby wraz z nakładającymi się działaniami naturalnych i antropogennych stresorów mogą prowadzić do różnorodnych zaburzeń w tym złożonym systemie. Oceny wrażliwości takiego systemu wymagają więc zintegrowanych badań. Autorka oparła swoje doświadczenia na śledzeniu zmian badając otwarte mikrokosmy glebowe w warunkach laboratoryjnych. Wybrała więc model uproszczony, w którym badania prowadzone w laboratorium umożliwiają symulowanie warunków i procesów, jakie mogą zachodzić w „naturalnych” systemach glebowych, w tym także warunki stresowe. Jednak w takich warunkach trudno jest uwzględnić zarówno dużą zmienność jakościową i ilościową uwzględnianych czynników abiotycznych i biotycznych. Z drugiej strony można pomijać zachodzące w systemach naturalnych skutki zmian klimatycznych, czy skutki oddziaływania substancji chemicznych na zmiany sezonowe organizmów glebowych. Zalety i wady takiego podejścia opisała w części wstępnej pracy. Za główny cel swoich badań przyjęła poszukiwanie odpowiedzi jak zanieczyszczenie gleby cynkiem wpłynie na funkcjonowanie mikrosystemów glebowych w różnych warunkach, takich jak zmiana temperatury, czy zmiany jakościowe w konstruowanych *de novo* uproszczonych sieciach pokarmowych. Na bazie gleby pobranej w lesie mieszanym z środowiska słabo narażonego na zanieczyszczenia (wschodnia Małopolska) przygotowała 144 mikrokosmy glebowe, które w połowie były inokulowane tylko bakteriami i grzybami zaś pozostałe, dodatkowo zasiedlane przez przedstawicieli mezofauny glebowej, przez trzy gatunki fitofagów i jeden gatunek drapieżnego roztocza. Parametry zmienne, do których odnosiła wyniki swoich badań to czas trwania doświadczenia (0-4 miesiące), temperatura (10°C, 20°C i 24°C) i stężenie Zn w glebie (22 i 500 mg/kg suchej masy gleby). Pozwoliło to na przeprowadzenie statystycznych analiz wyników na bazie 12 wzajemnych relacji i wykazanie jak przebiegały wzajemne współzależności między wybranymi wskaźnikami. Używając takiego modelu doświadczalnego wykorzystała szereg mierników końcowych dla oceny zmian profili funkcjonalnych zespołów mikroorganizmów, tempa respiracji wszystkich mikrokosmów, stabilności sieci troficznych, relacji drapieżca – ofiara, tempa dekompozycji materii organicznej, a także przekształceń związków azotowych.

Opisy dotyczące modelu całego doświadczenia, w tym przygotowania mikrokosmów, jak i wykonania wszystkich oznaczeń są w zasadzie wystarczające. Nie usatysfakcjonowało mnie uzasadnienie odnośnie doboru stężenia cynku dodawanego do połowy konstruowanych mikrokosmów, gdyż w stosunkowo niewielkim stopniu przekracza akceptowane stężenie przez mezofaunę i mikroorganizmy. Ponadto informacja bazująca tylko na całkowitym stężeniu metali w glebie (a takie wartości autorka zamieściła w pracy) nie jest wystarczające. Warto było również zacytować bardziej aktualne pozycje piśmiennictwa odnośnie stężeń metali w glebie i ich potencjalnej toksyczności niż te cytowane w pierwszych zdaniach rozdziału *Dyskusja*. Brak jest wyjaśnienia odnośnie doboru reprezentantów mezofauny, szczególnie dla skoczogonka *Sinella curviseta*, dla którego temperatura optymalna to około 30 °C, co jest o tyle istotne, że toksyczność różnych substancji jest odwrotnie skorelowana z temperaturą, odwrotnie niż u drugiego gatunku skoczogonka - *Folsomia candida*. Roztocz *Rhizoglyphus robinii* nie jest typowym gatunkiem glebowym, gdyż żeruje w warstwie humusowej, głównie na podziemnych częściach roślin, szczególnie cebulowych.

We *Wstępie* autorka wprowadza czytelnika w problematykę biologii gleby w aspekcie współczesnych zagrożeń powodowanych nakładaniem się naturalnych i antropogennych czynników stresowych. Dwa główne działy wstępu: *Soil biology* i *Soil pollution*, omawia na podstawie bogatego piśmiennictwa i obejmują również te zagadnienia, które wiążą się bezpośrednio z tematyką rozprawy. Moje dwa zastrzeżenia do tej części pracy dotyczą dwóch elementów: (1) braku graficznego i tabelarycznego wspomaganie tekstu, co mogłoby w znacznym stopniu udoskonalić sam tekst; (2) częstego pojawiania się cytowań publikacji za cytowaniami innych autorów, co sugeruje, że autorka ich nie czytała w oryginale. Ponieważ taka forma cytowania pojawia się również w rozdziale *Dyskusja* zadałem sobie trud sprawdzenia aktualnej dostępności przytaczanych 'za kimś' przykładów. Okazało się, że większość tak cytowanych publikacji można znaleźć w systemie Science Direct dostępnej we wszystkich krajowych sieciach uniwersyteckich. Dlatego można było uniknąć takiej formy cytowania, która nie powinna mieć miejsca w pracach naukowych. Prac cytowanych w ten sposób doliczyłem się 11 we *Wstępie* i 10 w *Dyskusji* i brak ich w rozdziale VI *References*.

Wykonanie badań w zakresie opisanym w rozprawie wymagało sporego nakładu czasu i musiało być poprzedzone żmudnym treningiem metodycznym. Doktorantka musiała opanować wiele procedur i technik wymaganych do właściwego ustalenia logistyki i przygotowania i wykonania doświadczeń, poczynwszy od pobrania prób glebowych, uzyskania zróżnicowanych mikrokosmów, skończywszy na opracowaniu i statystycznej analizie uzyskanych wyników. W oznaczeniach chemicznych i materiału biologicznego posługiwała się między innymi analizatorem pierwiastków CHNS a także spektrometrem absorpcji atomowej do oznaczania stężeń metali. Musiała opanować techniki stosowane obecnie w wyznaczaniu funkcjonalnych profili zespołów oddzielnie dla bakterii i grzybów stosując 96-komorowe mikroplątki Biolog®, Eco i FF. Sądząc po opisie zastosowanych procedur i uzyskanych wynikach były one przeprowadzone w sposób właściwy.

Większy kłopot sprawiły autorce doświadczenia z mikrokosmami zasiedlonymi przez mezofaunę. Wyniki rozprawy sugerują, że być może doktorantka zaplanowała zbyt małą liczbę skoczogonków i roztoczy wprowadzanych do mikrokosmów w stosunku do liczby polujących na nie roztoczy –

Hypoaspis aculeifer (nb. nazwy gatunkowe obu roztoczy zapisane są z błędem, str. 34), niedoszacowując apetyt drapieżcy. Z archiwalnych danych prof. Jerzego Karga (Pedobiologia, 1961, 1) wynika, że utrzymanie liczebności tego gatunku bardziej zależy od liczebności skoczogonków i roztoczy w zestawieniu z nicieniami glebowymi. Być może w znacznej mierze mogło się to przyczynić do szybkiego zaniku populacji mezofauny w mikrokosmach już po pierwszym miesiącu doświadczenia. Mimo stosunkowo szybkiej ekstynkcji mezofauny, autorka zbyt ogólnikowo podeszła do tego zagadnienia, zarówno w części wynikowej jak i w dyskusji wyników. Recenzent zdaje sobie jednak sprawę jak trudne było uzyskanie tak znaczącej liczby skoczogonków i roztoczy do zasiedlenia 144 mikrokosmów.

Rozdział Materiał i metody jest klarownie przygotowany i uwzględnia wszystkie techniki i procedury postępowania z próbkami glebowymi, konstrukcją mikrokosmów i ich zasiedlanie przez mikroorganizmy i mezofaunę a także przeprowadzone oznaczenia chemiczne i biologiczne wskaźniki do zaplanowanego doświadczenia. Zabrakło w tej części rozprawy wyjaśnienia odnośnie doboru i wykorzystania narzędzi statystycznych. Brak również informacji jak wyliczany był wskaźnik temperaturowy Q10 dla wyników uzyskanych w pomiarach respirometrycznych. W pracy podawane są wyniki odsetkowej zawartości materii organicznej, azotu i węgla tylko dla początkowego i końcowego punktu na osi czasu (t_0 i t_4), co osłabia możliwości pełniejszego wnioskowania. Zakładam, że to miedź, a nie kadm (str. 37; 39) powinna być wymieniana w zestawieniu pierwiastków analizowanych w glebie.

W rozdziale Wyniki Kandydatka wyodrębniła 5 podrozdziałów, w których opisuje i analizuje wyniki uzyskane metodami omówionymi we wcześniejszym rozdziale. Opis jest szczegółowy i zajmuje przeszło 20 stron wydruku. Tekstowi towarzyszą odpowiednie wykresy i tabele, których sekwencja tylko w niektórych fragmentach nie została zachowana. Nie utrudnia to śledzenia toku rozumowania autorki. Uważam, że tekst wraz z dokumentacją graficzną i tabelaryczną jest zbyt rozbudowany i przedstawiony w formie zbyt szablonowej. W tekście należało unikać częstego powtarzania tych samych danych, które pojawiają się nawet trzykrotnie: w tekście na wykresach i w tabelach. Zbytnie uszczegółowienie czyni opis monotonnym i może nawet dekoncentrować potencjalnego czytelnika, tym bardziej, że można je było łatwo znaleźć na solidnie przygotowanych wykresach (poza nielicznymi pomyłkami, gdy w opisach zadziałał znany mechanizm copy – paste. Tabele zawierają prawie pełną dokumentację wynikową. Także w tabelach można było również ograniczyć liczbę wierszy, pomijając te dane, dla których nie uzyskano potwierdzenia istotności zmian lub wzajemne współzależności były nieistotne. Pełne dane można było przedstawić w elektronicznym załączniku do głównego dokumentu rozprawy.

W pracy autorka podaje w postaci odsetkowej wyniki dla zawartości materii organicznej, azotu i węgla tylko dla początkowego i końcowego punktu na osi czasu (t_0 i t_4). Brak danych z pozostałych punktów czasowych (t_1 – t_3) osłabia możliwości pełniejszego wnioskowania. Autorka całkowicie zrezygnowała z omówienia wyników dotyczącego wymienionego na str. 36 czwartego punktu, wskazującego, że planuje techniką flotacyjną oceniać zmiany liczebności każdego z introdukowanych w mikrokosmach gatunków mezofauny. Tłumaczy od razu, że powodem zaniechania tego zadania było zanikanie mezofauny już po miesiącu trwania doświadczenia. Brak tych danych na pewno ograniczył możliwości dokonania pełniejszej analizy

funkcjonalnej dla połowy z przygotowanych mikrokosmosów. Szkoda, że autorka nie wykonała wcześniej pilotażowych doświadczeń, które aby się upewnić, że zaplanowany model konstrukcji mikrokosmów będzie mógł przetrwać okres dłuższy niż jeden miesiąc. W pracy brak informacji w jakim okresie rozpoczęła swoje doświadczenia i jak długo je prowadziła? Proszę o udzielenie informacji na ten temat.

W liczącej ponad 13 stron *Dyskusji* doktorantka nawiązuje tematycznie do zadań, które przedstawiła w końcowej części *Wstępu*. Wyróżniła trzy sekcje tego rozdziału, pierwsza – nienazwana – być może dlatego, że obejmuje różne aspekty potencjalnych oddziaływań różnych czynników – jak metale (głównie Zn), temperatura, obecność lub brak mezofauny w mikrokosmach głównie w odniesieniu do wyników uzyskanych z pomiarów respirometrycznych. Pozostałe sekcje to: *Soil microbial physiological profiles* i *Nitrogen mineralization and nitrification*. Autorka starała się nie powielać wiadomości ze *Wstępu* lub przytaczania przykładów, które powinny się znaleźć we *Wstępie* a nie w dyskusji. Niektóre fragmenty dyskusji są bardzo szeroko omawiane bez bezpośredniego powiązania z własnymi wynikami i odwrotnie, wiele jest powtórzeń wyników, o których już wcześniej pisała, zamiast posługiwać się cytowaniem tabel lub wykresów, w których są one zawarte.

Dyskusja pokazuje dojrzałość Autorki w poszukiwaniu najbardziej prawdopodobnych scenariuszy pozwalających na zrozumienie mechanizmów, które doprowadziły do wykazanych przez nią zaburzeń lub zmian powodowanych przez nadmiar cynku. W swoich rozważaniach stara się mieć pokrycie na faktach, a nie na domysłach. Analizując zależności, co do których ma wątpliwości i w świetle istniejącego piśmiennictwa nie jest w stanie wyjaśnić, stwierdza, że nie widzi rozsądnego wytłumaczenia. Niekiedy jednak stara się – nieraz niepotrzebnie – sugerować czytelnikowi przypuszczalne wyjaśnienia, choć nie ma ku temu wystarczających podstaw dowodowych. Generalnie, doktorantka dobrze potrafi poruszać się po bardzo zróżnicowanym tematycznie piśmiennictwie dotyczącym nieraz odległych systematycznie grup organizmów.

Recenzent widzi wiele znaczących osiągnięć badawczych, które autorka przedstawiła w rozprawie. Rozszerzają one wiedzę o procesach zachodzących w mikrośrodkowisku glebowym w warunkach stresu. Autorka wykazała, że:

- Zmiany temperatury mogą nasilać tempo respiracji mikrokosmów zasiedlonych mezofauną (MF), nawet w obecności stresora (cynk), podczas gdy ich ekstynkcja z takich mikrokosmów oddziałuje hamująco. W obecności tego samego stresora reakcja niezasiedlonych mezofauną mikrokosmów (MR) była odwrotna.
- Tempo respiracji mikrokosmów MF jest bardziej odporne na zmiany termiczne w obecności stresora (ponownie Zn), powodowane ubytkiem grzybów zjadanych przez mezofaunę i słabszej konkurencji z mikroorganizmami. Potencjalne skutki działania nadmiaru metalu/li mogą być kompensowane przez inne czynniki glebowe.
- Czynnikiem modulującym negatywne skutki działania nadmiaru cynku może być dostępność źródeł węgla i azotu. Malejąca dostępność organicznych źródeł węgla nasila wrażliwość termiczną mikrokosmów wraz z zanikaniem mezofauny (i zapewne grzybów) oraz nasiloną we wcześniejszym okresie degradacja związków węglowych przez same mikroorganizmy.

- Wyczerpywanie się zasobów dostępnej materii organicznej jest procesem fazowym. Obecność mezofauny, przez produkcję odchodów w pierwszej fazie doświadczenia, mogła powiększać zasoby organicznych związków węgla dla mikroorganizmów. Następstwem tego był wzrost ich aktywności enzymatycznej, co prowadziło do przyspieszenia rozkładu materii organicznej w systemie.
- Zróżnicowanie zależności korelacyjnych wskaźników aktywności funkcjonalnej mikroorganizmów i nadmiarem cynku w glebie - silna korelacja ze wskaźnikiem bogactwa metabolicznego (RS); w końcowej fazie doświadczenia silne korelacje z cynkiem wskaźników bioróżnorodności mikroorganizmów (H') oraz równomierności metabolicznej (I').
- Zasadnicze różnice korelacyjne dotyczyły mikroorganizmów, które najsilniej niż grzyby korelowały z cynkiem. Korelacje dla grzybów były bardziej zależne od obecności mezofauny, a więc typu mikrokosmu (MR vs MF).
- Powiązania analizowanych w pracy czynników (czas, nadmiar Zn, temperatura, typ mikrokosmu) z procesami przekształceń azotowych w glebie mogą się zmieniać według różnych scenariuszy, n.p. wysoka temperatura (24 °C) prowadzi do szybkiego wyczerpywania dostępnego węgla i azotu z frakcji organicznej gleby (wskaźnik - tempo respiracji),. W konsekwencji proces nitryfikacji jest hamowany i w glebie odkłada się NH_4^+ .

Piąta część – *Conclusions* - jest właściwie krótkim podsumowaniem tego co autorka w pracy osiągnęła. Wnioski z badań to tylko pierwsze i ostatnie dwa zdania tej sekcji, z którymi się zgadzam, choć brak w nich uszczegółowienia. Spodziewam się, że podczas obrony pracy Doktorantka udzieli dokładniejszych informacji w tym zakresie.

Piśmiennictwo wykorzystane w rozprawie jest bardzo bogate i zróżnicowane. Spis liczy 286 pozycji, rzadziej sięgających do starszych prac, co jest zrozumiałe ze względu na poruszaną tematykę badawczą. Niektóre pozycje nie zostały ujęte w spisie, np. Hopkins et al., 1989, niektóre prace zespołowe przypisywane są tylko pierwszemu autorowi.

Wniosek końcowy

Doktorantka jest bardzo dobrze i wszechstronnie przygotowana do pracy laboratoryjnej; potrafi posługiwać się nowoczesnymi technikami analitycznymi. Potrafi również całościowo widzieć problemy wymagające rozwiązania. Część eksperymentalna, jest dobrze opracowana, zinterpretowana i zamknięta adekwatnymi wnioskami końcowymi, których większość jest już umieszczona w rozdziale *Dyskusja*. Doktorantka ma dużą swobodę w posługiwaniu się językiem naukowym.

Zamieszczone w mojej opinii uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej wyników zamieszczonych w rozprawie, dającej wszelkie podstawy ubiegania się o stopień doktora nauk przyrodniczych. Dobór tematu jest dobrze przemyślany i istotny. Analizowane elementy rozprawy doktorskiej przedstawionej przez mgr Joannę Ziętarę oceniam pozytywnie. Doktorantka jest dobrze przygotowana do pracy laboratoryjnej; potrafi posługiwać się współczesnymi technikami analitycznymi. Potrafi również prowadzić badania terenowe. Opanowała wystarczająco zawiałości

przygotowywania i pisanie pracy naukowej. Szkoda, że w bazach danych nie doszukałem się publikacji z Jej udziałem, poza dwoma doniesieniami z międzynarodowych konferencji naukowych.

Ponieważ pozytywnie oceniam wartość merytoryczną pracy, jej wykonanie i sposób interpretacji, z przekonaniem stwierdzam, że rozprawa mgr Joanny Ziętary spełnia warunki stawiane przed rozprawami doktorskimi przez obowiązujące prawo określone w artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki wraz z późniejszymi zmianami Ustawy (Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz. 595; Nr. 164 , poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455), a także zawarte w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22.09. 2011 r. Dlatego proszę Wysoką Radę Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego zmierzające do nadania stopnia naukowego doktora.



Prof. dr hab. Paweł Migula