

prof. dr hab. Bogusław Wilkomirski  
Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach  
Wydział Matematyczno-Przyrodniczy  
Katedra Ochrony i Kształtowania Środowiska  
Zakład Biogeochemii Ekosystemów Lądowych  
ul. Świętokrzyska 15, 25-406 Kielce

Kielce, 7 lutego 2018.

### **Ocena rozprawy doktorskiej mgr Agaty Gryty**

#### **Wpływ egzogennej materii organicznej na różnorodność funkcjonalną i genetyczną mikroorganizmów oraz na aktywność enzymatyczną gleby**

wykonana na podstawie uchwały Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN z dnia 19. 01. 2018 r. (pismo Dyrektora Instytutu z dnia 22. 01. 2018 r.)

Niezwykły wprost sukces demograficzny gatunku *Homo sapiens* (obecnie na świecie żyje nas ponad 7,5 miliarda) powodujący, że liczba ludzi przewyższa niewspółmiernie liczebność jakiegokolwiek gatunku dzikich dużych ssaków, niesie ze sobą szereg problemów. Choć statyczna teoria zasobów Thomasa Malthusa opublikowana w końcu XVIII wieku bardzo się przeżyła i obecnie model maltuzjański opisuje sytuację gospodarczo-społeczną w małej liczbie krajów o niskim poziomie rozwoju ekonomicznego, a nauka bardziej się orientuje na schematy boserupiańskie lub kuzniecowskie, to jednak nie da się ukryć, że rozwój cywilizacyjny w wielu regionach świata hamowany jest przez problemy związane z rolnictwem. Wszak dynamiczny wzrost liczebności ludzi wiąże się coraz większymi wymaganiami produkcji rolniczej.

Ponieważ nie jesteśmy w stanie ominąć oczywistych ograniczeń przestrzennych, zarówno tych naturalnych, jak i związanych z antropopresją, coraz większy nacisk kładzie się na zwiększanie produktywności i żyzności gleby. Gleba jest elementem koniecznym w uprawie roślin użytkowych, a relacje typu „roślina – gleba” odgrywają fundamentalną rolę w cyklach biogeochemicznych. Jest to istotne nie tylko dla wąsko rozumianej działalności rolniczej, ale także w obszarze globalnych zmian środowiskowych, takich jak emisja gazów cieplarnianych, czy obieg węgla, gdyż szacuje się, że gleba wraz z roślinami zawiera prawie trzy razy więcej węgla niż atmosfera.

Dlatego też wszelkie prace naukowe związane z możliwościami poprawy żyzności i produktywności gleby należy uznać za ważne z punktu widzenia praktycznego, a jeżeli w dodatku prowadzone są przy zastosowaniu nowych technik eksperymentalnych, wykorzystujących instrumentalne metody fizyczno-chemiczne, biochemiczne, analizę

różnorodności genetycznej mikroorganizmów glebowych, czy analizę zróżnicowania funkcjonalnego zbiorowisk mikroorganizmów, mieszczą się na pewno w jednym z głównych nurtów badań środowiskowych.

Do takiego bloku badań należy niewątpliwie rozprawa doktorska przygotowana przez Panią mgr Agatę Grytę. Badania do ocenianej rozprawy zostały wykonane w ramach projektu pt. „Zagrożenia oraz korzyści wynikające z wprowadzania do gleb egzogennej materii organicznej” (CZ.3.22/1.2.00/12.03445) zrealizowanego w ramach Programu Operacyjnego Współpracy Transgranicznej Republika Czeska – Rzeczpospolita Polska 2007-2013, współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (EFRR). Wpisują się one doskonale w obszar zainteresowań badawczych promotora, Pani Profesor Magdaleny Frąc i kierowanego przez Nią zakładu, lokując się na pograniczu mikrobiologii i biochemii środowiskowej oraz badań utylitarnych z zakresu zagospodarowania odpadów przemysłu rolno-spożywczego.

Przedstawiona do oceny praca ma strukturę typową dla rozpraw doktorskich z wielu dziedzin nauk przyrodniczych. Jej układ, podział na rozdziały i podrozdziały nie budzi żadnych zastrzeżeń. Pracę rozpoczyna wprowadzenie, które choć skrótowo, to jednak precyzyjnie i jasno przedstawia zagadnienia teoretyczne uzasadniające podjęcie tematu pracy.

Kolejną dużą częścią rozprawy jest przegląd literatury, którego myślą przewodnią stały się bardzo ciekawie, logicznie i kompetentnie poprowadzone rozważania dotyczące różnych aspektów charakterystyki mikroorganizmów glebowych. A to bardzo ważne problemy, gdyż świat mikroorganizmów, ukazany przez Antoniego van Leeuwenhoeka i oswojony - przynajmniej częściowo - przez Ludwika Pasteura i Roberta Kocha jest czasami przyjazny, czasami groźny, ale na pewno tajemniczy i fascynujący. Od pewnego czasu świat ten przestał być domeną zainteresowań jedynie mikrobiologów i lekarzy, a zaczął być obiektem badań wielu dziedzin nauk przyrodniczych. Również grupa mikroorganizmów glebowych, stanowiąca znaczną część biomasy naszej planety ma bardzo istotne znaczenie. Ta część rozprawy ma charakter bardzo dobrego artykułu przeglądowego i mam nadzieję, że będzie mogła być wykorzystana do publikacji tego typu.

Zasadniczym celem rozprawy przygotowanej przez Panią Agatę Grytę było określenie wpływu stosowania egzogennej materii organicznej na aktywność oraz różnorodność funkcjonalną i genetyczną mikroorganizmów glebowych. Cel ten jest szeroki, ambitny i niełatwy do zrealizowania. Niewątpliwym ułatwieniem realizacji tak potężnego zadania badawczego jest zarysowanie, a w konsekwencji realizacja właściwie sformułowanych celów szczegółowych. Pani magister wywiązała się z tego bardzo dobrze, dzieląc realizację

zasadniczej linii programowej na trzy grupy problemów, czyli określenie różnorodności funkcjonalnej mikroorganizmów, określenie i porównanie genetycznej różnorodności archeonów utleniających amoniak (AOA) w glebie z dodatkiem różnych źródeł egzogennej materii organicznej (EOM) oraz określenie aktywności enzymatycznej wybranych enzymów po wprowadzeniu określonych rodzajów EOM.

Aby realizować tak szeroko zakrojone badania należy użyć odpowiednich, nowoczesnych metod badawczych. Czwarty duży rozdział rozprawy poświęcony został opisowi części doświadczalnej pracy, która została podzielona na dwie części. Pierwszy etap związany był doświadczeniami wazonowymi, w których oceniono wpływ sześciu typów odpadów organicznych (dwóch kompostów przemysłowych, trzech pofermentów oraz mączki pochodzenia zwierzęcego) na określone właściwości mikrobiologiczne gleby. Konsekwencją tego etapu było przeprowadzenie badań dotyczących dwóch wybranych typów odpadów (kompostu przemysłowego oraz mączki pochodzenia zwierzęcego) w warunkach dwuletniego doświadczenia polowego.

Rozdział poświęcony materiałom i metodom został napisany w sposób właściwy. Zwięzły opis odpadów, wykorzystanych w doświadczeniach jako źródło egzogennej materii organicznej, dobrze oddaje ich charakterystykę, zgromadzoną następnie zbiorczo w tabeli 3. Również opisy doświadczeń wazonowych i polowych pozwalają czytelnikowi na zrozumienie schematu eksperymentów. Nie mam też żadnych zastrzeżeń do opisu analizy różnorodności genetycznej mikroorganizmów glebowych oraz analiz biochemicznych.

Zasadniczą część rozprawy stanowi rozdział piąty, zatytułowany „Wyniki”. W rozdziale tym Autorka rozprawy opisuje rezultaty swoich badań, czyniąc z nich spójną całość, bardzo dobrze udokumentowaną bogatym materiałem ilustracyjnym. Na szczególne podkreślenie zasługuje świetne przedstawienie graficzne wyników analizy skupień obiektów gleby w postaci wielobarwnych plansz. Równie ciekawe i skłaniające do jednoznacznych wniosków są dendrogramy populacji AOA w badanych obiektach gleby.

Bardzo pozytywnym aspektem rozprawy jest to, iż ocenę jakości gleby przeprowadzono przy zastosowaniu szerokiego wachlarza metod i technik analitycznych. Przeprowadzono ocenę różnorodności fizjologicznej mikroorganizmów przy zastosowaniu trzech różnych typów płytek, dedykowanych dla odrębnych grup mikroorganizmów. Takie zestawienie i porównanie profili metabolicznych jest niewątpliwie bardzo precyzyjne i pozwala na dokładną ocenę stanu mikrobiologicznego gleby. Niewiele jest prac uwzględniających analizę różnorodności funkcjonalnej zbiorowisk mikroorganizmów w tak szerokim zakresie. Warto pamiętać, że ocena różnorodności fizjologicznej, genetycznej

mikroorganizmów oraz aktywności enzymatycznej gleby umożliwia określenie wpływu dodatków doglebowych na wszystkich płaszczyznach "mikrobiologii gleby".

Gdybym w tym miejscu miał wskazać na pewne niedociągnięcia pracy, mógłbym je scharakteryzować na czterech płaszczyznach:

- po pierwsze, analiza t-RFLP (analiza polimorfizmu długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych) została wykonana dla archeonów utleniających amoniak (AOA) – jako organizmów pełniących rolę indykatorów jakości gleby. Drugą grupą mikroorganizmów uznawaną za istotny indykator jakości gleby są bakterie utleniające amoniak (AOB) i nie zostały one badane w tej pracy. Oczywiście w najnowszych doniesieniach literaturowych można znaleźć wzmianki o tym, że AOA pełnią ważniejszą rolę niż AOB i niejako dominują nad bakteryjnymi odpowiednikami. Dlatego też ta uwaga ma charakter dyskusyjny. Poza tym, w praca doktorska ma swoje ograniczenia czasowe i objętościowe. Niemniej jednak, analiza polimorfizmu AOB wzbogaciłaby z pewnością pracę i dobrze byłoby, gdyby Autorka odniosła się do tego problemu w czasie obrony rozprawy.

- po drugie, do oceny enzymatycznej gleby zostały wykorzystane tylko dehydrogenazy i  $\beta$ -glukozydaza, będące ważnymi wskaźnikami jakości gleby. Oczywiście "enzymatyka gleby" daje dużo większe możliwości. Innymi ważnymi enzymami glebowymi, które w pracy nie zostały zbadane są na pewno: proteaza, fosfataza alkaliczna i kwaśna, ureaza. Oznaczenie wartości tych wskaźników na pewno byłoby wskazane, ale prawem autora każdej pracy jest uzasadnione dokonanie selekcji metod.

- po trzecie, w swojej pracy Pani Agata Gryta stosowała określone odpady organiczne. Warto byłoby wiedzieć, jaką zawartością toksycznych substancji (metale ciężkie, zanieczyszczenia organiczne) charakteryzują się zastosowane odpady. Zanieczyszczenia mogą przecież wpływać negatywnie na mikroorganizmy glebowe. Pewien ślad znalazłem w dyskusji, ale uważam, iż ten wątek należałoby rozwinąć.

- po czwarte, w opisie doświadczeń należałoby sprecyzować czas oddziaływania EOM na glebę, a nie podać tylko datę aplikacji, szczególnie dotyczy to drugiego terminu poboru prób.

Po drobiazgowym opisie wyników zwykle przychodzi czas na ich dyskusję, co Autorka uczyniła w rozdziale szóstym. Sposób napisania tej kilkunastostronicowej syntezy świadczy o bardzo dobrej umiejętności wyciągania wniosków z uzyskanych rezultatów pracy badawczej i konsultowania ich z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy. Warto zauważyć, że zarówno przegląd literaturowy, jak i dyskusja uzyskanych wyników opiera się bogatym materiale publikacyjnym. Bibliografia liczy 195 pozycji, przede wszystkim

artykułów z renomowanych czasopism naukowych, z czego 49 publikacji ukazało się roku 2010 lub później. Wynika z tego, że Autorka rozprawy bardzo dobrze orientuje się w literaturze przedmiotu i umie z niej korzystać.

Z obowiązku recenzenta muszę zauważyć pewne usterki w sekcji bibliograficznej. Istnieje wiele sposobów cytowania literatury, ale należy czynić to konsekwentnie. Jeżeli przyjęto podawanie pełnych tytułów czasopism, nie powinno podawać się ich skrótów, a znalazłem to w kilku przypadkach. Zauważyłem też brak spójnika „and” w kilku nazwach. W jednym miejscu (pozycja 21) nie została zachowana kolejność alfabetyczna. Cała praca jest jednak bardzo starannie napisana pod względem redakcyjnym, prawie nie ma tzw. literówek, czasami utrudniać czytanie mogą zbyt długie akapity, lub ich brak, jak np., we Wprowadzeniu.

Ostatni króciutki rozdział zatytułowany „Podsumowanie i wnioski” jest tylko postawieniem przysłowiowej kropki nad „i”. Wszystkie przedstawione wnioski są jak najbardziej prawidłowe i uzasadniające tezę, iż badania zostały podjęte w celu przybliżenia korzyści wynikających z aplikacji odpadów na tereny rolnicze, zarówno w kontekście rolnictwa, jak i gospodarki odpadami.

Zastosowane w pracy metody są technikami stosunkowo nowymi, a użyte metody tradycyjne są powszechnie uznanymi procedurami wykorzystywanymi w ocenie stanu mikrobiologicznego środowiska glebowego. Warto podkreślić też, że w podjętych badaniach dokonano oceny wpływu różnych źródeł egzogennej materii organicznej (kompostów, pofermentów, mączki). W wielu pracach tego typu znajduje się ocena wpływu jednego typu odpadów. W swojej pracy Autorka oceniła wpływ aż sześciu różnych źródeł egzogennej materii organicznej. Warto podkreślić też wykorzystanie płytek BIOLOG dla całych zbiorowisk.

Doktorat jest swoistą wizaż wjazdową w świat nauki. Ale pozostając przy tym porównaniu podróźniczym, nie wystarczy wjechać do jakiejś krainy, trzeba się jeszcze umieć po niej poruszać. Pani Agata Gryta udowodniła to nie tylko przedstawioną rozprawą doktorską, ale i dotychczasowym dorobkiem naukowym. Jestem daleki od patrzenia na młodego naukowca jedynie przez pryzmat nauko-metryczny, ale muszę przyznać, że współautorstwo dziewięciu oryginalnych artykułów naukowych przed uzyskaniem stopnia doktora robi wrażenie, tym bardziej, że osiem z nich zostało opublikowanych w czasopismach z tzw. „Listy A”, i to bynajmniej nie z dolnej jej części. Jeśli do tego dodamy rozdziały w monografiach, ekspertyzy naukowe, udział w konferencjach i popularyzację nauki, to jawi nam się obraz dojrzałej badaczki zjawisk przyrodniczych.

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej pt. " Wpływ egzogennej materii organicznej na różnorodność funkcjonalną i genetyczną mikroorganizmów oraz na aktywność enzymatyczną gleby" **stwierdzam, że praca ta spełnia z nawiązką wszystkie wymagania stawiane opracowaniom będącym podstawą do uzyskania stopnia naukowego doktora.** Dlatego też zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN z wnioskiem o **dopuszczenie mgr Agaty Gryty do dalszych etapów przewodu doktorskiego, w tym do publicznej dyskusji nad rozprawą.** Biorąc pod uwagę nowatorski charakter badań, które stwarzają nowoczesną i bardzo wartościową bazę dla poznania teoretycznych mechanizmów mikrobiologii gleb oraz praktycznych możliwości wykorzystania odpadów organicznych do celów rolniczych, wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN o **wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Agaty Gryty stosowną nagrodą.**



prof. dr hab. Bogusław Wilkomirski