

Dr hab. inż. Anna Piotrowska-Długosz, prof. UTP
Katedra Biogeochemii i Gleboznawstwa
Pracownia Gleboznawstwa i Biochemii
Wydział Rolnictwa i Biotechnologii
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy
w Bydgoszczy

Bydgoszcz, 22.02.2018

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Agaty Gryty

pt. „Wpływ egzogennej materii organicznej na różnorodność funkcjonalną i genetyczną mikroorganizmów oraz na aktywność enzymatyczną gleby”.

1. Podstawa opracowania recenzji

Recenzja przygotowana została w odpowiedzi na pismo Dyrektora Instytutu Agrofizyki Polskiej Akademii Nauk w Lublinie prof. dr hab. Cezarego Sławińskiego z dnia 22 stycznia 2018 roku informujące o powołaniu mnie na recenzenta (RN-0001-13/18, RN-431-11/15).

2. Ocena problematyki badawczej pracy

Zawartość materii organicznej w glebie odgrywa zasadniczą rolę w kształtowaniu się jej żyzności i produktywności, dlatego też powinno się dążyć do utrzymania jej właściwego poziomu. Spadek pogłowia zwierząt gospodarskich przyczynia się do zmniejszenia produkcji obornika i gnojowicy – nawozów, które uważane są za główne źródło odnawialnej materii organicznej w glebie. W związku z tym, zasadne wydaje się poszukiwanie innych jej źródeł, które przyczynią się do zwiększenia lub przynajmniej utrzymania się żyzności gleb na odpowiednim poziomie. W odniesieniu do tego problematyka, którą mgr Agata Gryta podjęła w pracy jest bardzo aktualna i interesująca. Oprócz tradycyjnie stosowanych praktyk, w celu zwiększenia ilości materii organicznej oraz poprawy żyzności gleby, stosuje się często dodatki tzw. egzogennej materii organicznej (EOM), takie jak osady ściekowe, produkty uboczne z branży spożywczej, kompostowane materiały pochodzące z odpadów przemysłowych i komunalnych, odpady pofermentacyjne czy mączki pochodzenia zwierzęcego. EOM może potencjalnie przyczynić się do wzrostu żyzności gleby, przy czym

efekt jej działania może być modyfikowany przez warunki glebowe, zabiegi agrotechniczne i warunki klimatyczne. Bezpieczne stosowanie EOM na gruntach ornych wymaga ścisłej kontroli potencjalnych zanieczyszczeń, do których zaliczyć można głównie metale śladowe oraz różne związki organiczne. Stosowanie EOM wpływa również na stan mikroflory glebowej, która odgrywa kluczową rolę w jej przemianach. Mikroorganizmy mogą rozkładać wszystkie naturalne związki organiczne oraz wiele syntetycznych, dzięki posiadaniu odpowiednich enzymów służących do ich hydrolizy. Z tego powodu konieczne jest prowadzenie badań nad wpływem różnych rodzajów EOM na funkcjonowanie i właściwości gleby. Badania te powinny być prowadzone w oparciu o krótko- i długoterminowe doświadczenia pozwalające określić właściwości fizyczne, chemiczne, jak i mikrobiologiczne gleby. Zwłaszcza ocena aktywności biologicznej gleby oraz genetycznej i funkcjonalnej różnorodności zespołów mikroorganizmów jest ważnym aspektem w kontekście zmian zachodzących w glebie pod wpływem stosowania różnego rodzaju EOM i może być ważnym wskaźnikiem jej stanu ekologicznego. Należy również pamiętać, że rolnicze wykorzystanie różnego rodzaju odpadów organicznych przyczynia się także do zmniejszenia się ilości odpadów wymagających składowania lub utylizacji.

3. Formalna strona rozprawy

Rozprawa doktorska Pani mgr Agaty Gryty pt. „Wpływ egzogennej materii organicznej na różnorodność funkcjonalną i genetyczną mikroorganizmów oraz na aktywność enzymatyczną gleby” wykonana została w Zakładzie Badań Systemu Gleba-Roślina Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie. Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. Magdalena Frąc.

Praca doktorska mgr Agaty Gryty liczy 160 stron. Całość została podzielona na 8 głównych rozdziałów, wyodrębnionych zgodnie z klasycznym schematem redagowania prac doktorskich. Są to:

1. Wprowadzenie;
 2. Przegląd literatury z trzema podrozdziałami I rzędu, w tym podrozdział 2.3. zawiera trzy podrozdziały II rzędu;
 3. Cel pracy
 4. Materiał i metody – z czterema podrozdziałami I rzędu; w tym podrozdział 4.4. zawiera trzy podrozdziały II rzędu;
 5. Wyniki – z dwoma podrozdziałami I rzędu zawierającymi po trzy podrozdziały II rzędu;
-

6. Dyskusja;
7. Podsumowanie i wnioski;
8. Bibliografia.

W pracy zamieszczono bogaty materiał dokumentacyjny obejmujący

- 9 tabel, z których dwie umieszczone zostały w Przeglądzie literatury, dwie znajdują się w rozdziale Materiał i metody i zawierają charakterystykę oraz dawki stosowanej egzogennej materii organicznej. Pozostałe 5 tabel przedstawia wartości wskaźników bioróżnorodności oraz zestawienie ilości otrzymanych T-RFs oraz całkowitą powierzchnię pików w uzyskanych profilach genetycznych,
- 53 kolorowe rysunki przedstawiające wyniki badań oraz wyniki ich analizy statystycznej, wykonane na wysokim profesjonalnym poziomie pod względem technicznym, estetycznym oraz merytorycznym.

Temat pracy określony w tytule jest komunikatywny i w pełni oddaje istotę rozprawy. Układ pracy jest poprawny, ale moim zdaniem w rozdziale *Cel pracy* powinno się zamieścić również hipotezy badawcze, których w pracy brakuje. Poszczególne rozdziały i podrozdziały pracy się zająbiają i stanowią logiczną całość, co ułatwia jej studiowanie. Praca jest napisana na ogół zwięzłym i stylistycznie poprawnym językiem, w sposób pozwalający na śledzenie prowadzonych badań i analizę uzyskanych wyników. Ma to istotne znaczenie ponieważ rozprawa obejmuje problematykę, która wymaga stosowania precyzyjnej terminologii, nie pozwalającej na wprowadzanie uproszczeń. Pozytywnie oceniając pracę w całości i doceniając wysiłek Doktorantki w realizację zakresu badań musiałam jednak zwrócić uwagę na kilka niedociągnięć w recenzowanej rozprawie, co jest obowiązkiem recenzenta. Swoje uwagi, często charakterze polemicznym, zaznaczyłam po odniesieniu się do każdego rozdziału w punkcie Merytoryczna ocena pracy. Drobne błędy stylistyczne i uwagi redaktorskie, niemające wpływu na ocenę merytoryczną rozprawy doktorskiej, zaznaczyłam w tekście.

4. Merytoryczna ocena pracy

Streszczenia (w języku polskim i angielskim) są napisane właściwie. Wyczerpująco i w zwięzły sposób zaprezentowano w nich cel, metody, wyniki i najważniejsze konkluzje wynikające z przeprowadzonych badań.

Rozprawa doktorska rozpoczyna się krótkim *Wprowadzeniem* w obszar problematyki badawczej, w którym Autorka nakreśliła w sposób wystarczający potrzebę badań o tej tematyce.

W obszernym, bo aż 36 stronicowym, rozdziale *Przegląd literatury* Autorka informuje o zagadnieniach, które porusza w swojej rozprawie doktorskiej. Rozdział ten został napisany poprawnie pod względem merytorycznym i bogato poparty cytatai literaturowymi, co świadczy o szerokiej znajomości problematyki badawczej. W kolejnych podrozdziałach Doktorantka, wykorzystując przegląd krajowej i światowej literatury, omawia szeroko zagadnienia dotyczące występowania i funkcji mikroorganizmów w glebie, ich różnorodności i aktywności oraz problemy jakie napotykaą badania mikroorganizmów w glebie. Ponadto Autorka charakteryzuje materię organiczną oraz jej rolę w glebie a także pochodzenie egzogennej materii organicznej oraz jej oddziaływanie na środowisko glebowe, w tym mikroorganizmy glebowe. Na uwagę zasługuje zwłaszcza dobrze opracowany podrozdział dotyczący trudności i ograniczeń badań nad różnorodnością mikroorganizmów glebowych oraz zalet i wad technik molekularnych i biochemicznych stosowanych w badaniach różnorodności mikrobiologicznej. Cały rozdział został napisany wyczerpująco, jasno i ładnym językiem. Czyni to dobrą podstawę do analizy zastosowanej metodologii i dyskusji wyników. Uwagi do rozdziału: (1) ponieważ Autorka nie stosowała w swoich badaniach obornika, słomy czy osadów ściekowych, zbędny wydaje się ich dość szczegółowy opis, (2) na stronie 19 oraz 20 Autorka podaje dane procentowe nie podając ich oryginalnego źródła, (3) określenie „przewodność hydrauliczna” proponuję w przyszłości zamienić na „przewodnictwo wodne” częściej stosowane w literaturze, (3) drobne błędy stylistyczne zaznaczono w maszynopisie.

Rozdział *Material i metody* zawiera odpowiednio: charakterystykę zastosowanych źródeł egzogennej materii organicznej, opis doświadczenia wazonowego i polowego oraz szczegółowy opis metod analitycznych dotyczących analizy różnorodności genetycznej i funkcjonalnej mikroorganizmów oraz aktywności enzymatycznej badanej gleby. Praca pod względem metodycznym została wykonana prawidłowo. Na szczególną uwagę i pochwałę zasługuje zastosowanie w pracy nowoczesnych metod biologii molekularnej do oznaczenia różnorodności genetycznej i funkcjonalnej zespołów mikroorganizmów glebowych. Dzięki zastosowaniu technik molekularnych możliwe jest pozyskanie dotąd nieosiągalnej informacji na temat dużej (97-99%) grupy mikroorganizmów VBNC (ang. *Viable But Not Culturable*) tzw. żywych ale niehodowanych. Do oceny zróżnicowania genetycznego mikroorganizmów Doktorantka zastosowała analizę długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych (t-RFLP).

Technika ta obejmuje 5 głównych etapów: ekstrakcję genomowego DNA, amplifikację wybranego genu, trawienie produktów reakcji PCR enzymami restrykcyjnymi oraz rozdział i detekcję fragmentów powstałych w wyniku restrykcji. Ocena różnorodności funkcjonalnej oparta została na analizie profilu metabolicznego gleby (system BIOLOG) z zastosowaniem płytek dedykowanych ogólnej ocenie aktywności metabolicznej mikroorganizmów a także ocenie aktywności grzybów oraz organizmów beztlenowych. Określenie różnorodności funkcjonalnej mikroflory glebowej ma istotne znaczenie w monitorowaniu stanu gleb, dostarczając informacji o udziale mikroorganizmów w procesach przemiany materii organicznej w środowisku glebowym i jest coraz częściej wykorzystywane do oceny wpływu różnych czynników środowiskowych i antropogenicznych na jakość tego środowiska. Zastosowana metodyka badań świadczy o bardzo dobrym opanowaniu przez Doktorantkę nowoczesnego warsztatu badawczego.

Uwagi do rozdziału: (1) pobieżna charakterystyka gleby jaką zastosowano w wazonach oraz wykorzystano w doświadczeniu polowym (podano tylko pH i zawartość C organicznego), (2) brakuje informacji odnośnie warunków pogodowych występujących na obszarze, gdzie zlokalizowane było doświadczenie polowe, które to warunki mogą mieć znaczenie w kształtowaniu różnorodności i aktywności mikroorganizmów glebowych, (3) opis/schemat doświadczenia mógłby być przedstawiony w formie tabeli – byłby bardziej czytelny, (4) brakuje wyników/informacji o ewentualnym występowaniu (lub nie) związków szkodliwych w zastosowanych materiałach organicznych (5) brak informacji o statystycznym opracowaniu wyników i zastosowanych wskaźnikach, np. indeksie Shannon, (6) inne drobne błędy stylistyczne zostały zaznaczone w rozprawie.

W 80 stronicowym rozdziale *Wyniki* Autorka bardzo szczegółowo i wnikliwie omówiła uzyskane wyniki, które zilustrowała przejrzystymi, estetycznie wykonanymi tabelami i rysunkami. Zarówno tytuły tabel, jak i rysunków są komunikatywne i jednoznacznie informują czytelnika o rodzaju przedstawianych danych i analizowanych właściwościach. Autorka wykazała się dobrą i wyważoną interpretacją uzyskanych rezultatów. Sposób ich przedstawienia spełnia wymogi współczesnych opracowań naukowych.

Uwagi do rozdziału: (1) niektóre akapity powinny być umieszczone w *Przeglądzie literatury* lub *Dyskusji* wyników (np. strona 49 drugi akapit, str. 79 część akapitu pierwszego, str. 90, (2) zbędne jest stosowanie w tym rozdziale odnośników literaturowych, (3) definicja AWCD oraz indeksu Shannona (str. 50) powinna być podana w rozdziale *Material i metody* z podaniem literatury źródłowej, (4) dla zobrazowania całokształtu warunków panujących w

glebie rozdział powinien zawierać wyniki podstawowych parametrów fizyko-chemicznych gleby, które mogły być kształtowane przez zastosowane rodzaje EOM i oddziaływać na mikroorganizmy glebowe, (5) podrozdział 5.2.2. powinien mieć tytuł „Ocena wpływu wybranych EOM na różnorodność genetyczną archeonów utleniających amoniak (AOA)” a nie „Ocena wpływu wybranych EOM na różnorodność genetyczną mikroorganizmów glebowych”, (5) szkoda, że tak obszerny rozdział nie został zakończony częścią syntetyczną, wskazującą na zależności pomiędzy badanymi parametrami oraz zastosowanymi EOM (np. analiza korelacji).

Obszerny rozdział *Dyskusja* jest generalnie bardzo dobrze napisaną częścią całego opracowania i charakteryzuje się wysokim poziomem naukowym. W tym rozdziale mgr Agata Gryta przeprowadziła wnikliwą konfrontację uzyskanych rezultatów z wynikami prezentowanymi przez innych autorów, co świadczy o bardzo dobrym rozpoznaniu podjętej problematyki badawczej. Autorka wykazuje dociekliwość w wyjaśnieniu przyczyn wykazanych wyników, co znacznie podnosi wartość rozprawy doktorskiej.

Uwagi do rozdziału: (1) na stronie 130 Autorka pisze „Hipoteza przedstawionej pracy zakłada...” chociaż wcześniej takowej hipotezy nie zamieściła, (2) pewne wątki *Dyskusji* powinny zostać przeniesione do *Przeglądu literatury*, ponieważ nie odnoszą się bezpośrednio do uzyskanych wyników, np. strony 128-129, 131-132, 138-139 albo do rozdziału *Material i metody*, np. krótki opis kompostów umieszczony na stronie 137.

W rozdziale *Podsumowanie i wnioski* Autorka przedstawiła łącznie osiem wniosków, ale tylko trzy z nich (wnioski 3-5) ściśle odpowiadają postawionym celom pracy (strona 37). Dwa pierwsze i dwa ostatnie wnioski można potraktować jako ogólne podsumowanie, czy jako wniosek podsumowujący.

Bazę bibliograficzną rozprawy stanowi 195 pozycji literaturowych, w znacznej mierze angielskojęzycznych (85%), które pod względem formalnym cytowane są w sposób właściwy. Udział publikacji wydanych w ostatnim dziesięcioleciu jest znaczący i wynosi ponad 40%. Drobne niedociągnięcia techniczne zaznaczono w tekście.

5. Wniosek końcowy

Po zapoznaniu się z przedstawioną rozprawą doktorską uważam, że Pani mgr Agata Gryta wykazała się szeroką wiedzą w zakresie podjętej problematyki badawczej. Autorka dobrze opanowała umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Doktorantka wniosła nową wiedzę w rozwiązanie problemu naukowego, w pełni osiągnęła zamierzony cel naukowy i praktyczny dysertacji. Recenzowaną rozprawę doktorską oceniam pozytywnie i

uważam, że wskazane uchybienia i błędy nie wpływają istotnie na jej wartość naukową, gdyż mają głównie charakter porządkujący i są możliwe do usunięcia na etapie przygotowywania publikacji.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymagania określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 ze zm. W Dz. U. z 2005 r., nr 164, poz. 1365). Wniosuję zatem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN o dopuszczenie Pani mgr Agaty Gryty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Anna Grohowska-Dygas